



---

# Bachelorarbeit

---

Frau

**Carolin Poch**

**Anreicherung verschiedener  
physiologischer  
Mikroorganismengruppen aus  
Seesedimenten und  
Biogasanlagen mit Relevanz  
für den Biogasprozess**

Mittweida, 2012

## **Bachelorarbeit**

---

# **Anreicherung verschiedener physiologischer Mikroorganismengruppen aus Seesedimenten und Biogasanlagen mit Relevanz für den Biogasprozess**

Autor:

**Frau**

**Carolin Poch**

Studiengang:

**Biotechnologie / Bioinformatik**

Seminargruppe:

**BI09w2-B**

Matrikelnummer:

**23622**

Hochschulbetreuer:

**Prof. Dr. rer. nat. Dirk Labudde**

betrieblicher Betreuer:

**Dr. Katharina Porsch**

Zeitraum:

**6. Fachsemester (01.06.2012 – 31.08.2012)**

## **Bibliografische Beschreibung**

Poch, Carolin:

Anreicherung verschiedener physiologischer Mikroorganismengruppen aus Seesedimenten und Biogasanlagen mit Relevanz für den Biogasprozess. 2012. 93 Seiten. Mittweida, Hochschule Mittweida, Fakultät Mathematik, Naturwissenschaften, Informatik, Bachelorarbeit, 2012

Referat:

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in zwei Themengebiete. Im ersten Teil wurden anaerobe, thermophile, lignocellulolytische Mikroorganismen aus dem Thermalsee Héviz in Ungarn mit Weizenstroh angereichert, wobei der Abbau des Stroh mit verschiedenen analytischen Methoden verfolgt wurde. Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit der Abschätzung der Zellzahl von Eisenoxidierern, sowie Eisen- und Sulfatreduzierern in drei verschiedenen Laborreaktoren mittels der „Most probable Number“-Methode.

## **Danksagung**

Die vorliegende Arbeit entstand während meines Bachelorstudiums am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung - UFZ in Leipzig. An dieser Stelle möchte ich mich bei all denjenigen bedanken, die mich während des gesamten Studiums und während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben.

Ein besonderer Dank gilt meiner Betreuerin am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung, Frau Dr. Katharina Porsch, welche mir dieses sehr interessante Thema überließ und das Vertrauen in meine Person zur wissenschaftlichen Umsetzung hatte. Danke für die unentwegte Geduld und die sehr lehrreiche Betreuung während meiner gesamten Zeit.

Herrn Prof. Dr. Dirk Labudde danke ich ganz herzlich für die Betreuung von Seiten der Hochschule Mittweida während der Bachelorarbeit, sowie während des gesamten Studiums. Es war mir eine Freude in Ihren Vorlesungen zu sitzen und ich habe wirklich viel von Ihnen gelernt.

Ein großer Dank geht an meine Eltern, Irina und Andreas Poch, die mir das Studium erst ermöglicht und mich in jeder Hinsicht unterstützt haben. Danke, dass ihr immer für mich da seid.

Ich danke ebenfalls Christian Hofmann für die liebevolle Unterstützung sowie für seine stets gewissenhafte und durchdachte Handlungsweise. Zusammen sind wir die Eins!

Des Weiteren danke ich Anne Nöldner und Christin Türke für die schöne und unvergessliche Zeit während des Studiums - Mädels, ihr seid einfach wunderbar!

Schließlich möchte ich Gerrit Helm, Marcus Kohlhase, Carla Wunsch und Florian Schattenberg danken, die ich während meiner Zeit am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung kennen lernen durfte und die mir stets mit ihren lehrreichen und auch humorvollen Anmerkungen zur Seite standen.

# Inhaltverzeichnis

Abbildungsverzeichnis.....	III
Tabellenverzeichnis.....	IV
Abkürzungsverzeichnis .....	V
1 Einleitung .....	1
1.1 Der Biogasprozess.....	1
1.2 Stroh als Substrat für den Biogasprozess .....	5
1.2.1 Lignocelluloseaufbau.....	5
1.2.2 Lignocelluloseabbau.....	7
2 Zielsetzung.....	8
3 Material und Methoden.....	9
3.1 Anreicherung lignocellulolytischer Mikroorganismen aus dem Seesediment eines Thermalsees .....	9
3.1.1 Verwendete Materialien.....	9
3.1.2 Methoden .....	12
3.2 Abschätzung der Zellzahl verschiedener Mikroorganismengruppen in Biogasreaktoren mittels der MPN-Methode.....	18
3.2.1 Verwendete Materialien.....	18
3.2.2 Methoden .....	24
4 Ergebnisse .....	32
4.1 Anreicherung lignocellulolytischer Mikroorganismen aus dem Seesediment eines Thermalsees .....	32
4.2 Abschätzung der Zellzahl verschiedener Mikroorganismengruppen in Biogasreaktoren mittels der MPN-Methode.....	45
5 Diskussion.....	50
5.1 Anreicherung lignocellulolytischer Mikroorganismen aus dem Seesediment eines Thermalsees .....	50
5.1.1 Sediment- und Typhakulturen.....	50

5.1.2 Negativkontrollen.....	55
5.2 Abschätzung der Zellzahl verschiedener Mikroorganismengruppen in Biogasreaktoren mittels der MPN-Methode.....	57
5.2.1 Untersuchte Mikroorganismengruppen in den drei Biogasreaktoren.....	57
5.2.2 $\text{Fe}_{\text{tot}}$ -, $\text{Fe}^{2+}$ -, Nitrat- und Sulfidgehalt der Reaktoren .....	59
5.2.3 Vergleich mit weiteren MPN-Studien .....	61
6 Zusammenfassung.....	64
7 Ausblick.....	66
Literatur.....	67
Anlagen.....	i

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Stufen des Biogasprozesses .....	3
Abbildung 2 Aufbau der Lignocellulose.....	6
Abbildung 3 Gasvolumenmessgerät.....	14
Abbildung 4 Ansetzen der MPN-Platten .....	27
Abbildung 5 Kumulatives Gasvolumen der Anreicherungskulturen Sediment (Sed) und Typha, sowie der Negativkontrollen (NK) .....	33
Abbildung 6 Kumulatives Gasvolumen des 1. Transfers der Sediment- (Sed) und Typhakulturen, sowie der Negativkontrollen (NK).....	34
Abbildung 7 Gaszusammensetzung der Anreicherungskulturen Sediment (Sed) und Typha, sowie der Negativkontrollen (NK) .....	35
Abbildung 8 Gaszusammensetzung des 1. Transfers der Sediment (Sed) und Typha, sowie der Negativkontrollen (NK) .....	36
Abbildung 9 pH-Wert der Anreicherungskulturen Sediment (Sed) und Typha, sowie der Negativkontrollen (NK) .....	37
Abbildung 10 pH-Werte des 1. Transfers der Sediment- (Sed) und Typhakulturen, sowie der Negativkontrollen (NK) .....	38
Abbildung 11 HPLC-Ergebnisse der Anreicherungskulturen (a) Sediment und (b) Typha, sowie (c) der Negativkontrollen .....	40
Abbildung 12 HPLC-Ergebnisse der Anreicherungskulturen (a) Sediment und (b) Typha, sowie (c) der Negativkontrollen .....	42
Abbildung 13 Visuelle Analyse der Kulturen und der Negativkontrolle des 1. Transfers ..	44
Abbildung 14 Most Probable Number des Reaktors 4.1 (Schlempereaktor) für (a) Eisenreduzierer, (b) Sulfatreduzierer und (c) Eisenoxidierer.....	46

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Zugegebene Elektronendonoren und -akzeptoren zur Erstellung der selektiven Wachstumsmedien für die MPN-Platten .....	25
Tabelle 2 Überblick über die MPN-Ergebnisse und die Gesamtzellzahl aller drei Reaktoren: Reaktor 3.1 (Hühnertrockenkotreaktor), Reaktor 4.12 (Stroh- und Schlemperreaktor) und Reaktor 4.1 (Schlemperreaktor) .....	47
Tabelle 3 Ergebnisse der photometrischen Tests ( $\text{Fe}^{2+}$ -, $\text{Fe}_{\text{tot}}$ - und Sulfidtest) und des Nitrattests der drei Reaktorabläufe: Reaktor 3.1 (Hühnertrockenkotreaktor), Reaktor 4.12 (Stroh- und Schlemperreaktor) und Reaktor 4.1 (Schlemperreaktor) .....	49
Tabelle 4 Reaktionen der hydrogenotrophen und acetoklastischen methanogenen Archaeen.....	54



## Abkürzungsverzeichnis

A. dest.	lat. <i>Aqua destillata</i> (destilliertes Wasser)
anox.	anoxisch
cm WS	Zentimeter Wassersäule
DMPD	N,N-Dimethyl-p-Phenylendiammonium-Dichlorid
DSMZ	Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EEG	Erneuerbare-Energie-Gesetz
et al.	lat. <i>et alii</i> (und andere)
Fe(II)	chemische Formel für nicht gelöstes zweiwertiges Eisen
Fe(III)	chemische Formel für nicht gelöstes dreiwertiges Eisen
Fe <sup>2+</sup>	chemische Formel für gelöstes zweiwertiges Eisen
Fe <sup>3+</sup>	chemische Formel für gelöstes dreiwertiges Eisen
Fe <sub>tot</sub>	totaler Eisengehalt
FM	Frischmasse
GC	Gaschromatografie
HAHCl	Hydroxylammoniumhydrochlorid
HPLC	engl. <i>high-performance liquid chromatography</i> (Hochleistungsflüssigkeitschromatographie)
MO	Mikroorganismen
MPN	Most Probable Number
PBS-Puffer	engl. phosphate buffered saline (Phosphatgepufferte Salzlösung)
rpm	engl. rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
TS	Trockensubstanz
VE-Wasser	Vollentsalztes Wasser

# 1 Einleitung

Ein aktuelles Thema unserer heutigen Gesellschaft sind die stetig knapper werdenden fossilen Energiequellen, welche im Wesentlichen auf Energieträgern wie Erdöl und Erdgas basieren. Die Nachfrage nach regenerativen Energien steigt deshalb weiterhin an, nicht nur um den Treibhauseffekt zu reduzieren, sondern auch um nachhaltige Energiequellen zu erschließen und damit eine Alternative zu den fossilen Brennstoffen zu entwickeln [Weiland, 2010]. Zu dieser Form der Energiegewinnung zählt unter anderem die anaerobe Vergärung von Biomasse, welche in Biogasanlagen eingesetzt wird. Mit dem Erneuerbaren-Energie-Gesetz (EEG), welches seit dem Jahr 2000 die vorrangige Einspeisung in das Stromnetz, die feste Einspeisevergütungen von Strom aus Erneuerbaren Energien und seit 2009 auch die Verwendung von Erneuerbaren Energien im Bereich der Kälte- und Wärmeerzeugung regelt [EEG, 2011], hat sich die Zahl der Biogasanlagen allein in Deutschland in den letzten fünf Jahren auf über 7000 Anlagen im Jahr 2011 nahezu verdreifacht [Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V., 2011]. Die meisten Biogasanlagen in Deutschland wurden im landwirtschaftlichen Kontext errichtet und durch das EEG gefördert. Die typischen Substrate für die Biogasanlagen sind daher Gülle und Maissilage. Während der anaeroben Vergärung von Biomasse entsteht das Biogas, welches hauptsächlich aus Methan, Kohlenstoffdioxid und Wasser besteht, wovon jedoch nur Methan energetisch genutzt werden kann [Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V., 2010].

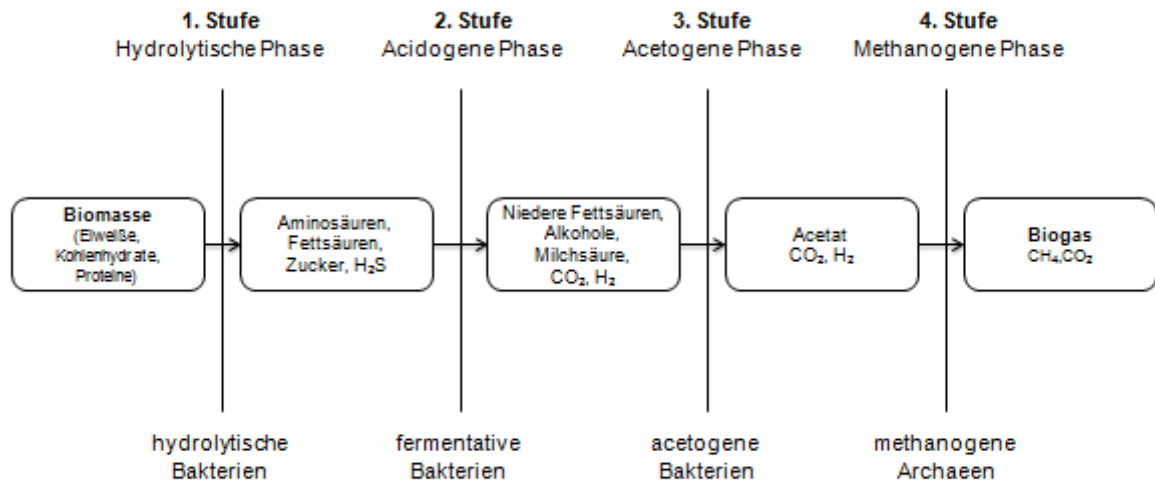
## 1.1 Der Biogasprozess

Der Biogasprozess ist im Allgemeinen ein anaerober Abbau von Biomasse und wird speziell in Biogasanlagen zur Energiegewinnung eingesetzt. Für die technische Anwendung dieses anaeroben Prozesses wird zwischen zwei Temperaturbereichen unterschieden: mesophiler (37 °C - 43 °C) und thermophiler (50 °C - 60 °C) Bereich [Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V., 2010]. Da das Wachstumsoptimum der meisten am Biogasprozess beteiligten Mikroorganismen im mesophilen Bereich liegt, werden ca. 85 % der landwirtschaftlichen Anlagen in diesem Bereich betrieben [Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V., 2006]. Ein weiterer Grund für die mesophile Fahrweise einer Biogasanlage ist die hohe Störunempfindlichkeit im Vergleich zu Biogasanlagen, welche im thermophilen Bereich betrieben werden. Dies ist auf die thermophilen Mikroorganismen zurückzuführen, welche empfindlicher auf Temperaturschwankungen und Hemmstoffe, wie Ammoniak, reagieren als die mesophilen Mikroorganismen [Angelidaki und Ahrens, 1994]. Trotz der genannten Nachteile existieren

jedoch einige thermophil betriebene Anlagen. Diese haben unter anderem den Vorteil, dass eine höhere Abbaugeschwindigkeit der Biomasse erreicht wird und der Fermenterinhalt aufgrund seiner geringeren Viskosität leichter gerührt und gepumpt werden kann. Des Weiteren wird eine Biogasanlage im thermophilen Temperaturbereich betrieben, wenn gesundheitsschädliche Keime durch Hygienisierung des Substrates abgetötet werden sollen [Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V., 2010].

Für die Produktion des Biogases werden Substrate aus verschiedenen Industriebereichen eingesetzt. Neben den Substraten aus der Landwirtschaft (nachwachsende Rohstoffe, Rinder- oder Schweinegülle) werden auch Substrate aus der weiterverarbeitenden Agroindustrie (Bierherstellung, Alkoholgewinnung, Kartoffelverarbeitung) eingesetzt [Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V., 2010]. Die Methanausbeute hängt im Wesentlichen von der Zusammensetzung des eingesetzten Substrates ab. In vielen Biogasanlagen kommen daher Substratmischungen zum Einsatz, wie beispielsweise Maissilage und Gülle, um einen möglichst hohen Methangehalt und damit einen ebenfalls hohen Energiegehalt zu erzielen. Der Methangehalt ist der wichtigste Anteil des gebildeten Biogases, da dieser den brennbaren Anteil darstellt und über den Energiegehalt des Biogases entscheidet. Beispielsweise Maissilage hat einen Methangehalt von 53 % und besitzt den höchsten Biogasertrag bezogen auf die Tonne Frischmasse im Vergleich zu verschiedenen anderen Substraten (Schweinegülle, Zuckerrübe oder Apfeltrester), welche typischerweise in Deutschland in den Biogasanlagen eingesetzt werden [Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V., 2011] (Anlage 1).

Biogas entsteht durch den mikrobiellen Abbau des eingesetzten Substrates unter anaeroben Bedingungen in vier aufeinanderfolgenden Phasen: Hydrolyse, Acidogenese, Acetogenese und Methanogenese. Diese vier Phasen laufen zeitlich parallel und meistens in einem Biogasreaktor ab. In jeder einzelnen Phase beteiligen sich verschiedene Arten anaerober Mikroorganismen, abhängig von pH-Wert, Temperatur und anderen Parametern, direkt am Biogasprozess [Weiland, 2010]. Anhand von Abbildung 1 werden nachfolgend die vier Abbaustufen, sowie die daran beteiligten Mikroorganismengruppen und Zwischenprodukte vorgestellt.



**Abbildung 1 Stufen des Biogasprozesses** Dargestellt sind die vier Phasen des Biogasprozesses, sowie die beteiligten Mikroorganismen und die einzelnen Zwischenprodukte [Weiland, 2003 - angepasst durch Carolin Poch].

In der ersten Phase, der Hydrolyse, werden komplexe Verbindungen des Ausgangsmaterials, wie Kohlenhydrate, Eiweiße und Fette durch hydrolytische Bakterien in Oligomere und Monomere, wie Zucker, Aminosäuren und Fettsäuren gespalten. Zusätzlich entstehen dabei gasförmige Produkte wie Kohlenstoffdioxid oder Schwefelwasserstoff [Weiland, 2010]. Die gebildeten Zwischenprodukte werden in der Acidogenese durch fermentative Bakterien zu niedrigen Fettsäuren, wie Propion-, Essig- und Buttersäure sowie zu Milchsäure und Alkoholen abgebaut. Daneben werden aber auch Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff gebildet [Gerardi, 2003].

Während der Acetogenese werden die entstandenen Zwischenprodukte anschließend durch acetogene Bakterien zu Acetat, Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid umgesetzt. Für diese Phase des Biogasprozesses spielt der Wasserstoffpartialdruck eine große Rolle. Eine zu hohe Konzentration an Wasserstoff verhindert aus energetischen Gründen die Umsetzung der Produkte aus der Acidogenese zu Acetat, sodass sich organische Säuren anreichern, welche wiederum die Methanbildung hemmen. Die acetogenen Bakterien stehen daher in syntropher Beziehung zu den methanogenen Archaeen, welche Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid zu Methan umsetzen und für die richtigen Milieubedingungen der acetogenen Bakterien sorgen [Weiland, 2010].

Die letzte Phase des Biogasprozesses, die Methanbildung, kann auf zwei unterschiedlichen Wegen durch methanogene Archaeen stattfinden [Demirel und Scherer, 2008]. Einerseits entsteht Methan durch die direkte Umsetzung von Acetat mit Hilfe der acetoclastischen Methanbildner, wobei als weiteres Produkt Kohlenstoffdioxid entsteht. Andererseits produzieren hydrogenotrophe Methanogene aus Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid ebenfalls Methan und Wasser.

Das entstandene Biogas besteht hauptsächlich aus Methan (50-75 %), Kohlenstoffdioxid (25-45 %) und Wasser (2-7 %). Zusätzlich enthält das Biogas je nach Substrat geringe Mengen an Wasserstoff (<1 %), Schwefelwasserstoff (< 2 %), Sauerstoff (< 2 %) und Ammoniak (<1 %) [Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V., 2010].

Neben den Mikroorganismen, welche aktiv am Biogasprozess beteiligt sind, existieren in einer Biogasanlage weitere Mikroorganismen, wie die eisenoxidierenden, eisen- und sulfatreduzierenden Mikroorganismen, welche indirekt am Biogasprozess beteiligt sind. Diese oxidieren zweiwertiges Eisen zu Eisen(III), reduzieren ungelöstes Eisen(III) zu gelöstem zweiwertigem Eisen [Straub et al., 2001] und Sulfat zu Sulfid, Hydrogensulfid bzw. Schwefelwasserstoff je nach vorliegendem pH-Wert [Chen et al., 2008]. Die Konzentration der entstehenden Produkte hängt stets vom eingetragenen Substrat ab.

Sulfat wird einerseits durch verschiedene Eisen(II)-Sulfate (z.B. Ferrogranul20®), welche direkt zum Substrat zugegeben werden, in die Biogasanlage eingetragen. Diese Eisensulfatminerale dienen der Entschwefelung des Biogases [Althaus und Urban, 2005; Henkelmann et al., 2012]. Andererseits wird Sulfat durch verschiedene Tierexkreme wie beispielsweise Gülle und durch Raps oder Rapsprodukte, welche einen erhöhten Anteil an organischen Schwefelkomponenten besitzen, in die Biogasanlage eingebracht [Stolte, 2000; Henkelmann et al., 2012]. Zudem gelangt Sulfat durch proteinreiche und somit schwefelhaltige Substrate wie z.B. Schlempe, Getreide, Schweinegülle oder Geflügelkot in eine Biogasanlage [Bayerisches Landesamt für Umwelt, 2007]. Es ist wichtig den Gehalt an eingetragendem Sulfat in eine Biogasanlage zu kontrollieren, um eine erhöhte Konzentration an Schwefelwasserstoff in einer Biogasanlage zu vermeiden, da diese zu Korrosionen führt, toxisch für verschiedene Mikroorganismen ist und somit die Methanbildung hemmen kann [Henkelmann et al., 2012].

Eisen wird hauptsächlich durch Eisenminerale (z.B. FerroSorp®) in die Biogasanlagen eingebracht. Dies dient dazu, entstehenden toxischen und korrosiven Schwefelwasserstoff in der Biogasanlage zu binden, wobei am Ende Eisensulfidminerale und Wasser entstehen [Hego Biotech GmbH, 2008]. Die Nachteile der Eisenminerale wie FerroSorp® sind, dass ein kontinuierlicher Einsatz dieser Mineralmischung notwendig ist und, dass das eingesetzte Eisen mit Spurenelementen und anderen Makronährstoffen bereits in der Biogasanlage ausfällt, wie z.B. Eisenphosphate. Diese Nährstoffe stehen somit den Mikroorganismen in der Biogasanlage und den Pflanzen nach der Ausbringung des Gärrestes nicht mehr zur Verfügung [Henkelmann et al., 2012]. Eisenminerale werden folglich nur bei Substraten verwendet, welche einen hohen Schwefelgehalt in die Biogasanlage eintragen [Henkelmann et al., 2012].

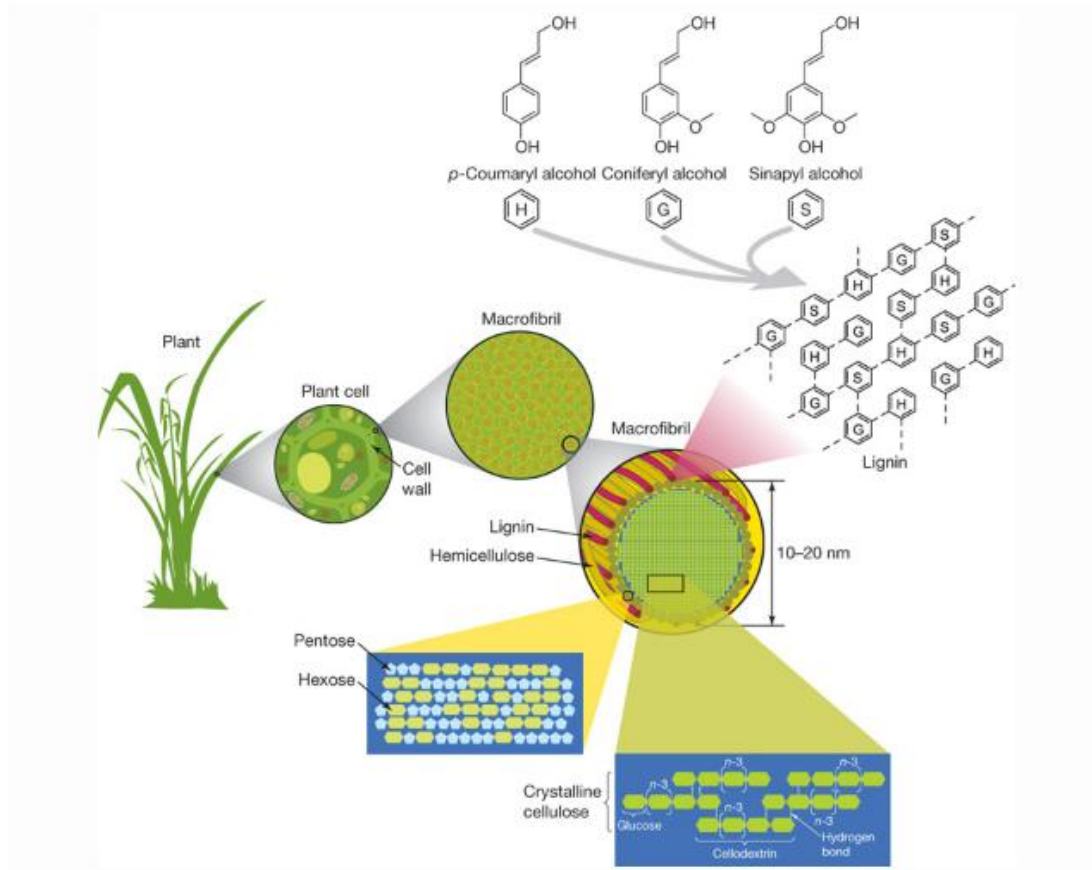
Zusätzlich zu den oben genannten Problemen konkurrieren die eisenoxidierenden sowie sulfat- und eisenreduzierenden Mikroorganismen in einer Biogasanlage um Nährstoffe und Substrate mit den Mikroorganismen, welche direkt am Biogasprozess teilnehmen und haben somit einen indirekten Einfluss auf den Biogasprozess.

## **1.2 Stroh als Substrat für den Biogasprozess**

Für die Bereitstellung der notwendigen Biomasse für den Biogasprozess sind speziell dafür produzierte Energiepflanzen für die Umwelt problematisch. Eine Alternative dazu wäre, den Substratanteil einer Biogasanlage an landwirtschaftlichen und sonstigen organischen Abfallstoffen zu erhöhen, um somit für eine nachhaltige Nutzung landwirtschaftlicher Reststoffe für die Bioenergiebereitstellung zu sorgen [Zeller et al, 2011]. Zu diesen Abfallstoffen zählt Stroh, welches das bislang größte ungenutzte Potential besitzt und somit eine große Möglichkeit für die energetische Nutzung darstellt. Im Durchschnitt fallen in Deutschland jährlich insgesamt ca. 30 Millionen Tonnen Getreidestroh an, wovon nur ca. 8 Millionen Tonnen unter ökologischen und technischen Aspekten tatsächlich genutzt werden können. Der Nachteil des Getreidestrohs ist der hohe Ligninanteil, welcher für die schwere mikrobielle Abbaubarkeit des Strohs verantwortlich ist [Taherzadeh und Karimi, 2008]. So besitzt zum Beispiel Weizenstroh einen Ligninanteil von ca. 18-25 %, während Silomais einen Ligninanteil von nur ca. 4-8 % aufweist [Kruse et al., 2005]. Im Nachfolgenden werden der Aufbau und der Abbau von Lignocellulose, in die das Lignin eingelagert ist, beschrieben.

### **1.2.1 Lignocelluloseaufbau**

Lignocellulose dient pflanzlichen Zellen als stabile Gerüst- und Struktursubstanz [Schieder et al, 2010]. Als typische Lignocellulosesubstrate gelten halmgutartige Pflanzen und Pflanzenteile, wie Gräser und Stroh. Im Durchschnitt besteht die Trockenmasse pflanzlicher Zellen zu ca. 80 % aus Lignocellulose, welche aus den drei Hauptkomponenten Cellulose, Hemicellulose und Lignin aufgebaut ist (Abbildung 3).



**Abbildung 2 Aufbau der Lignocellulose** Dargestellt ist der schematische Aufbau der Lignocellulose einer Pflanze [Rubin, 2008].

Die Cellulose und die Hemicellulose bilden das Strukturgerüst in den Zellwänden, in welches das Lignin eingelagert ist (Lignifizierung) [Rubin, 2008].

Die häufigste Komponente innerhalb der Lignocellulose ist die Cellulose. Hierbei handelt es sich um ein Polysaccharid, welches aus Glukosemolekülen besteht, die über  $\beta$ -1,4-glykosidische Bindungen miteinander verbunden sind [Rubin, 2008]. Die parallel angeordneten Celluloseketten sind über Wasserstoffbrückenbindungen zu sogenannten Mikrofibrillen zusammengelagert und bilden das Grundgerüst der Lignocellulosestruktur [Schieder et al, 2010]. Die Hemicellulose ist die zweithäufigste Komponente innerhalb der Lignocellulose und stellt ebenfalls ein Polysaccharid des Strukturgerüsts dar. Hemicellulose besteht aus verschiedenen Fünf- und Sechsfachzuckern, wie beispielsweise Arabinose, Glukose oder Xylose [Rubin, 2008]. Bei Lignin handelt es sich um ein hoch verzweigtes und somit schwer biologisch abbaubares Polymer, welches im Wesentlichen aus drei verschiedenen Phenolen besteht: Sinapylalkohol, Coniferyl- sowie Coumarylalkohol. Das Polymer wird nachträglich, während des Prozesses der Verholzung von pflanzlichen Zellen, in das Gerüst eingelagert und ist für die Festigkeit und den Schutz des pflanzlichen Gewebes verantwortlich [Rubin, 2008 und Abdel-Rahman et al., 2011].

### 1.2.2 Lignocelluloseabbau

Für den anaeroben Abbau der Lignocellulose ist eine komplexe Zusammenarbeit von vielen verschiedenen Enzymen notwendig. Aufgrund der schlechten Zugänglichkeit der Lignocellulosestruktur für hydrolytische Enzyme, wird die Hydrolyse der Lignocellulose oft als der langsamste und somit geschwindigkeitsbestimmende Schritt beim anaeroben Abbau von Lignocellulose dargestellt [Schieder et al, 2010]. An einigen Stellen, an denen die Lignocellulosestruktur für Enzyme zugänglich ist, können Cellulose und Hemicellulose unter anaeroben Bedingungen relativ leicht zu vergärbaren Zuckermolekülen abgebaut werden. Lignin hingegen kann aufgrund seiner chemischen Struktur nicht oder nur sehr langsam mikrobiologisch abgebaut werden [Taherzadeh und Karimi, 2008]. Bei der Vergärung von Lignocellulose bleiben faserige Reste im Gärrest bestehen, welche vor allem schwer abbaubares Lignin enthalten. Der Abbau der Lignocellulose ist daher umso langsamer bzw. geringer, je größer der Ligninanteil des Materials ist [Schieder et al, 2010]. So werden Substrate mit einem hohen Ligninanteil, wie beispielsweise Holz, in einer Biogasanlage praktisch nicht umgesetzt [Nultsch, 1968].



## 2 Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit ist in zwei Themenbereiche untergliedert. Das Ziel des ersten Themenbereichs war die Anreicherung von lignocellulolytischen Mikroorganismen aus einem Thermalsee in Ungarn, welche potentiell zum anaeroben Abbau von Lignocellulose in thermophilen Biogasanlagen eingesetzt werden können und sich direkt am Biogasprozess beteiligen. Für die Umsetzung wurden lignocelluloseverwertende Mikroorganismen aus dem Thermalsee Héviz in Ungarn (Anlage 2) in anoxischem Flüssigmedium unter thermophilen, pH-neutralen Bedingungen angereichert, kultiviert und Weizenstroh als lignocellulosehaltige Biomasse gewählt. Mit Hilfe verschiedener Analysemethoden, wurde der Abbau des Weizenstrohs verfolgt.

Der zweite Themenbereich dieser Arbeit beschäftigt sich mit den Mikroorganismen, welche sich indirekt am Biogasprozess beteiligen: Eisenoxidierer, sowie Eisen- und Sulfatreduzierer. Es wurden speziell diese Mikroorganismengruppen ausgewählt, da diese mit anderen Mikroorganismen in einer Biogasanlage um Substrate bzw. Nährstoffe konkurrieren und da die Produkte, welche durch die mikrobielle Reduktion bzw. Oxidation entstehen, sich nicht nur negativ auf das produzierte Biogas und den Gärrest, sondern auch auf die gesamte Biogasanlage auswirken. Daher ist es wichtig, den Anteil der oben genannten Mikroorganismen in einer Biogasanlage zu untersuchen, um herauszufinden, wie signifikant ihr Anteil an der Gesamtzellzahl der Mikroorganismen ist. Ziel dieses Projektes war die Abschätzung von Eisenoxidierern, sowie von Eisen- und Sulfatreduzierern in drei Biogasreaktoren im Labormaßstab. Durch die Herstellung von Verdünnungsreihen von den drei Reaktorproben in selektivem Wachstumsmedium, deren Inkubation für sechs Wochen und der Anwendung der MPN (Most Probable Number)-Methode sollten die Zellzahlen der oben genannten metabolischen Mikroorganismengruppen ermittelt werden.

## 3 Material und Methoden

Der Material- und Methodenteil gliedert sich, wie die gesamte vorliegende Arbeit, in zwei Abschnitte. Für die Anreicherung von lignocelluloseverwertenden Mikroorganismen aus dem ungarischen Thermalsee Héviz (Kap. 3.1) werden zunächst die verwendeten Proben sowie die Zusammensetzung des Mediums, die verwendeten Lösungen und das Weizenstroh beschrieben. Anschließend werden die zugehörigen Kultivierungsvorbereitungen und die begleitenden Analysen vorgestellt. Im zweiten Teil dieses Kapitels (Kap. 3.2) werden die Materialien und die Methoden, darunter die verschiedenen Analysetests für die Abschätzung von Eisenoxidierern, sowie Eisen- und Sulfatreduzierern mittels der MPN-Methode vorgestellt.

### 3.1 Anreicherung lignocellulolytischer Mikroorganismen aus dem Seesediment eines Thermalsees

#### 3.1.1 Verwendete Materialien

##### 3.1.1.1 Mikroorganismen

Für das Ansetzen der Anreicherungskulturen wurden Sedimentproben aus dem Thermalsee Héviz in Ungarn verwendet. Dabei wurde jeweils eine Probe aus dem Sediment der mit Schilf bewachsenen Uferzone in 0,5 m Wassertiefe und aus dem Sediment in der Seemitte in ca. 2 m Wassertiefe entnommen (Anlage 2). Die Benennung der Anreicherungskulturen erfolgte nach den Probenahmestellen im See:

**Typha:** Sediment aus der Umgebung mit Rohrkolben in Ufernähe

**Sediment:** Sediment aus der Bodenregion in Seemitte

Die lignocelluloseverwertenden Mikroorganismen wurden anaerob in 50 mL- bzw. 100 mL-Kulturflaschen kultiviert. Als Kulturmedium diente das modifizierte Medium 640 der DSMZ (Deutsche Stammsammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen) und als Lignocellulosequelle wurde zerkleinertes Weizenstroh verwendet. Die Kulturen wurden alle zwei bis vier Wochen, nachdem die Gasproduktion stagnierte, in frisches Medium überimpft. Die Inkubation erfolgte jeweils bei 55 °C und einem Start-pH-Wert von 7,3.

### 3.1.1.2 Zusammensetzung des Mediums, verwendete Lösungen und Lignocellulosequelle

Als Grundlage für die Kultivierung wurde das DSMZ Medium 640 (Caldicellulosiruptor-Grundmedium) von der DSMZ in modifizierter Form verwendet. Dieses Medium enthält neben Hefeextrakt zusätzlich als Kohlenstoffquelle Pepton. Für die Anreicherungskulturen wurde die Menge an Pepton und Hefeextrakt in diesem Medium um die Hälfte verringert. Statt Cellobiose oder Cellulose wurde Weizenstroh als cellulosehaltiges Substrat verwendet.

- **modifiziertes Caldicellulosiruptor-Grundmedium (DSMZ Medium 640) [URL-1]**

NH <sub>4</sub> Cl	0,90 g
NaCl	0,90 g
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	0,40 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,75 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,50 g
Pepton	1,00 g
Hefeextrakt	0,50 g
Spurenelementelösung SL-10 (DSM 320)	1 mL
FeCl <sub>3</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	2,50 mg
Resazurin	0,50 mg
oxisches A. dest.	ad. 1.000 mL

Das Medium wurde aus der Nährbodenküche des Departments Umweltmikrobiologie des Helmholtz-Zentrums für Umweltforschung - UFZ in Leipzig bezogen. Für die Entfernung von Restsauerstoff wurde dieses Grundmedium mindestens 30 min in der Anaerobox (N<sub>2</sub>:H<sub>2</sub> ca. 98%:2%) gerührt, in eine Flasche mit Butylgummistopfen überführt und anschließend autoklaviert (20 min, 121 °C, 2 bar).

- **anoxisches Reinstwasser bzw. anoxisches Leitungswasser**

Das Reinstwasser bzw. Leitungswasser wurde in einer Mikrowelle zum Kochen gebracht. Anschließend wurde die Flüssigkeit 10 min und der Gasraum der Flasche 1 min mit Stickstoff begast, um die vorhandene sauerstoffhaltige Luft durch Stickstoff auszutauschen. Die Flasche wurde anschließend luftdicht verschlossen.

- **Cystein-HCl-Monohydratlösung**

Cystein-HCl * H <sub>2</sub> O	0,75 g
anox. Reinstwasser	25 mL

Zur Lagerung der anoxischen (anox.), sterilen Cystein-HCl-Monohydratlösung (30 g/L) wurde eine sterile, anoxische Kulturflasche verwendet, welche durch einen Butylgummistopfen und einen Aluminiumring luftdicht verschlossen war. Das Cystein-HCl-Monohydrat wurde in der Anaerobbox (N<sub>2</sub>:H<sub>2</sub> ca. 98%:2%) in Reinstwasser gelöst und mit einem Spritzenvorsatzfilter (Cellulosemischester-Membran, Porengröße 0,2 µm) in die vorbereitete Kulturflasche steril filtriert. Die Lagerung der Cystein-HCl-Monohydratlösung erfolgte für maximal zwei Wochen im Kühlschrank. Nach dieser Zeit wurde die Lösung nicht weiter verwendet.

- **Natriumhydroxidlösung**

NaOH	0,5 g
anox. Reinstwasser	25 mL

Die 0,5 M Natriumhydroxidlösung wurde, wie für die Cystein-HCl-Monohydratlösung beschrieben, mit einem Spritzenvorsatzfilter in eine anoxische, sterile Kulturflasche steril filtriert.

- **Cellulosequelle**

Als Cellulose- bzw. Lignocellulosequelle wurde Weizenstroh verwendet, welches in einer Hammermühle in ca. 3 cm kleine Stücke zerkleinert wurde.

### **3.1.1.3 Chemikalien, Geräte, Materialien**

Die verwendeten Chemikalien, Geräte sowie Materialien sind in der Anlage 3 aufgelistet.

### 3.1.2 Methoden

#### 3.1.2.1 Kultivierungsvorbereitungen

Für die Kultivierungsansätze wurde zunächst zerkleinertes Weizenstroh in 50 mL- bzw. 100 mL-Kulturflaschen eingewogen:

pro 50 mL-Kulturflasche 0,25 g Stroh

pro 100 mL-Kulturflasche 0,50 g Stroh

Für die Entfernung des Sauerstoffs wurden die einzelnen Kulturflaschen offen in die Anaerobbox ( $N_2:H_2$  ca. 98%:2%) eingeschleust. Dabei wurden die Flaschen zweimal in der Schleuse evakuiert und anschließend für mindestens 30 min anoxisch aufbewahrt. In jede Flasche wurde anoxisches Leitungswasser pipettiert, sodass das Stroh bedeckt war:

pro 50 mL-Kulturflasche 5 mL anoxisches Leitungswasser

pro 100 mL-Kulturflasche 10 mL anoxisches Leitungswasser

Anschließend wurden die Kulturflaschen mit Butylgummistopfen und Aluminiumringen verschlossen, ausgeschleust und für 24 h bei 55 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Kulturflaschen erneut in die Anaerobbox eingeschleust und das anoxische Leitungswasser abgegossen. Dieser Vorgang diente dazu, um eventuell vorhandene Sporen im Stroh in vegetative Zellen umzuwandeln, welche anschließend durch das Autoklavieren abgetötet wurden. Die Flaschen mit dem nassen Stroh wurden in der Anaerobbox mit Butylgummistopfen und Aluminiumringen verschlossen und bei 121°C, 30 min und 2 bar autoklaviert. Das verwendete Medium und die Kulturflaschen mit Stroh wurden separat autoklaviert, um einen thermischen Dampfdruckaufschluss des Strohs zu verhindern. Nach dem Abkühlen wurde das Medium mit Hilfe der Hungate-Methode [Hungate, 1969] mit sterilen und Stickstoff gespülten Spritzen und Kanülen in die Kulturflaschen mit Stroh überführt:

pro 50 mL-Kulturflasche 23,5 mL Medium

pro 100 mL-Kulturflasche 47 mL Medium

Die Zugabe der Zusätze Cystein-HCl-Monohydratlösung und Natronlauge zu dem Grundmedium erfolgte ebenfalls anoxisch und steril mit der Hungate-Technik [Hungate, 1969]. Cystein wurde als Schwefelquelle und Reduktionsmittel hinzugefügt, um Spuren von Sauerstoff zu reduzieren. Für die Einstellung des pH-Wertes auf 7,3 wurde Natronlauge hinzugegeben, da das Medium einen sauren pH-Wert von 4,3 besaß.

pro 50 mL-Flasche 600 µL Cystein-HCl-Monohydratlösung und 700 µL NaOH

pro 100 mL-Flasche 1,2 mL Cystein-HCl-Monohydratlösung und 1,4 mL NaOH

Für das Ansetzen der Anreicherungskulturen aus den Sedimentproben des Thermalsees wurden die Kulturflaschen nach der Zugabe der Zusätze in die Anaerobbox eingeschleust und geöffnet. Zu den Kulturflaschen wurden jeweils 2-3 g Probe anoxisch mit einem sterilen Spatel hinzugegeben, sodass pro Seeprobe zwei Kulturen entstanden.

Um anschließend für die Kultivierungsansätze bei jedem neuen Transfer die gleiche Startmenge an Mikroorganismen (MO) von  $10^6$  MO/mL zu erhalten, wurde das zugegebene Volumen der vorherigen Kultur mit Hilfe von Formel 1 berechnet:

$$\text{[Formel 1]} \quad V_1 \text{ [mL]} = \frac{X_1}{X_2} * V_2$$

$X_1$  = gewünschte Anzahl MO/mL in der neuen Kultur (hier:  $10^6$  MO/mL)

$X_2$  = Anzahl MO/mL der Vorkultur (siehe Formel 3)

$V_1$  = zugegebenes Volumen der Vorkultur zum neuen Medium [mL]

$V_2$  = Volumen des anzuimpfenden Mediums [mL]

Das nach Formel 1 berechnete Volumen der Vorkultur wurde zu den 50 mL- bzw. 100 mL-Kulturflaschen, welche bereits die Cellulosequelle, das Medium und die Zusätze enthielten, mit Hilfe von sterilen, mit Stickstoff gespülten Spritzen und Kanülen unter der Sterilbank hinzugegeben [Hungate, 1969]. Anschließend wurden die Kulturen bei 55 °C für ca. zwei bis vier Wochen inkubiert, bevor eine erneute Überimpfung in frisches Medium stattfand. Während dieser Zeit wurden verschiedenen Methoden genutzt, um das Wachstum der Mikroorganismen sowie die Produkte des Strohabbaus zu analysieren. Dabei wurden folgende Probenintervalle gewählt:

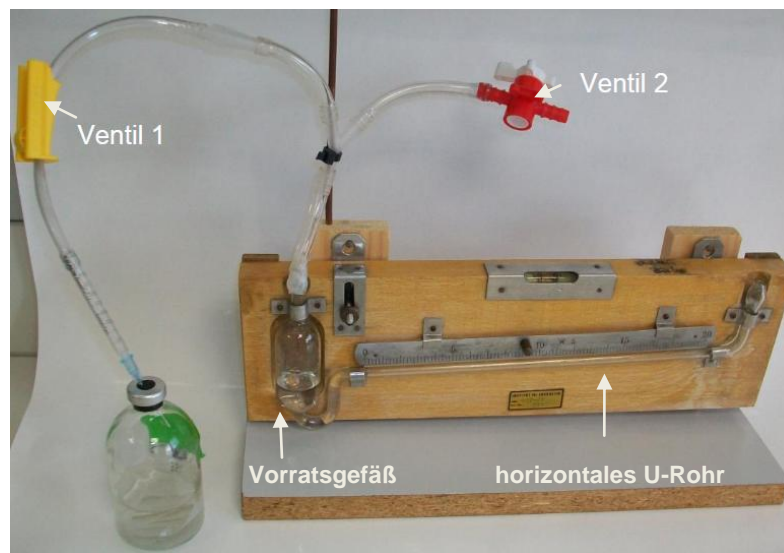
- |  |                              |
|--|------------------------------|
| • Gasvolumenbestimmung   | 3-mal pro Woche              |
| • pH-Wert  | 1-mal pro Woche              |
| • Analyse der Gasphase mit Hilfe der Gaschromatographie (GC)                                   | 1-mal pro Woche              |
| • Analyse der Flüssigphase mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. HPLC) | 1-mal pro Woche              |
| • visuelle Beschreibung und Dokumentation der Kulturflaschen                                   | 1-mal pro Woche              |
| • Bestimmung der Gesamtzellzahl  | 1-mal pro Transfer (am Ende) |

Die genannten kultivierungsbegleitenden Analysemethoden werden im folgenden Kapitel näher erläutert.

### 3.1.2.2 Kultivierungsbegleitende Analysen

#### Bestimmung des gebildeten Gasvolumens

Um das gebildete Gasvolumen zu bestimmen, wurde ein horizontales U-Rohr verwendet (Abbildung 3). Als Sperrflüssigkeit wurde dabei eine saure, salzhaltige Lösung (50 g Natriumchlorid und 1,25 g Zitronensäure) in 250 mL voll entsalztem Wasser (VE-Wasser) verwendet.



**Abbildung 3 Gasvolumenmessgerät** Dies ist ein horizontales U-Rohr, welches für die Bestimmung des gebildeten Gasvolumens in den Kulturflaschen genutzt wurde. Ventil 1 reguliert den Gaseingang und Ventil 2 den Gasausgang. Das Vorratsgefäß enthält eine saure, salzhaltige Sperrflüssigkeit.

Die Kulturflasche, bei der das Gasvolumen gemessen werden sollte, wurde über eine Kanüle an das Messgerät angeschlossen und anschließend Ventil 1 geöffnet. Der Gasüberdruck, welcher sich in der Flasche aufgebaut hatte, bewirkte, dass die Flüssigkeit aus dem Vorratsgefäß in das horizontale U-Rohr verdrängt wurde und sich somit der Flüssigkeitsstand im U-Rohr veränderte. Das Ventil 1 wurde geschlossen und das verdrängte Flüssigkeitsvolumen wurde an einer Skala in cm WS (Zentimeter Wassersäule) abgelesen. Mit Hilfe des Ventils 2 wurde das Gas aus der Apparatur entlassen und die Flüssigkeit strömte in das Vorratsgefäß zurück. Dieser gesamte Vorgang wurde so oft wiederholt, bis sich der Flüssigkeitsstand im horizontalen U-Rohr nicht mehr veränderte und in der Kulturflasche wieder Umgebungsdruck herrschte.

Durch sogenanntes Auslitern wurde ermittelt, dass 20 cm WS 3 mL Gas entsprechen. Um das Rohgasvolumen der einzelnen Kulturflaschen von unterschiedlichen Zeitpunkten

miteinander vergleichen zu können, wurden die Werte des Rohgasvolumens auf Normaldruck (101,325 kPa), Normtemperatur (273,15 K) und durch Entfernung des Wasserdampfdruckes mittels der Antoinegleichung normalisiert (Formel 2).

[Formel 2]

$$V_N[\text{mL}] = \frac{\left( p_u[\text{kPa}] - 10^{\left( \frac{7,1962 + \frac{1730,63}{233,426 + T_u[^\circ\text{C}]}}{\text{[kPa]}} \right)} \right) \cdot 273,15 \text{ K}}{101,325 [\text{kPa}] \cdot (273,15 + T_u[^\circ\text{C}]) \text{ K}} \cdot V_{\text{Gas}}[\text{mL}]$$

$p_u$  = Umgebungsdruck [kPa]

$T_u$  = Umgebungstemperatur [ $^\circ\text{C}$ ]

$V_{\text{Gas}}$  = Rohgasvolumen [mL]

Die errechneten Gaswerte wurden anschließend auf das, durch die Probenahme abnehmende, Flüssigkeitsvolumen in der Kulturflasche bezogen. So wurden die Werte für das gebildete Gasvolumen in mL Gas pro mL Flüssigkeit ermittelt, welche anschließend kumuliert wurden. Diese Methode war aufgrund der Ermittlung des Umrechnungsfaktors zwischen cm WS und Gasvolumen in mL nur semiquantitativ. Da dies jedoch eine schnelle und einfache Methode zur Gasmessung darstellte und der Vergleich der einzelnen Kulturen untereinander möglich war, wurde in diesem Projekt diese Methode zur Gasmessung angewendet.

### Bestimmung des pH-Wertes

Für eine zeitnahe Charakterisierung der Säurebildung wurden der Flüssigphase der jeweiligen Kultur wöchentlich mit Hilfe der Hungate-Technik ca. 100  $\mu\text{L}$  Probe entnommen [Hungate, 1969]. Anschließend erfolgte eine direkte Messung mittels pH-Teststreifen im Bereich von pH 6 - 10 bzw. pH 3,1 - 8,3.

### Analyse der Gaszusammensetzung mit Hilfe der Gaschromatographie (GC)

Für die Analyse der Gasphase wurden 20 mL-Headspace-Vials mit Butylhohlstopfen verwendet. Die Vials wurden mindestens 30 min mit Argon, welches auch als Trägergas für die GC diente, zur Luftverdrängung gespült. Anschließend wurde mittels der Hungatetechnik [Hungate, 1969] 1 mL Gasraum aus der Kulturflasche entnommen und in die Headspace-Vials überführt, wodurch eine Verdünnung der Probe von 1:21 erreicht



wurde. Pro Vial wurden zwei GC-Messungen durchgeführt, aus denen ein Mittelwert gebildet wurde. Anschließend wurden die gemessenen Werte auf 100 % normalisiert. Für die Bestimmung der Gaszusammensetzung wurde der mit einem thermischen Leitfähigkeitsdetektor ausgestattete Gaschromatograph CP-2002P eingesetzt. Zur Auftrennung wurden zwei Säulen verwendet, die parallel betrieben wurden. Die Kalibrierung des GC fand anhand von definierten Prüfgasen statt. Als Prüfgase wurden reiner Wasserstoff, reines Kohlenstoffdioxid, reiner Stickstoff und künstliches Biogas verwendet. Das künstliche Biogas enthielt ca. 40 % CO<sub>2</sub>, 59 % CH<sub>4</sub> und <0,005 % O<sub>2</sub>, <0,005 % H<sub>2</sub>S sowie <0,005 % H<sub>2</sub>. Von den Prüfgasen wurden 100, 250, 500 und 1000 µL in je ein mit Argon gespültes Vial übertragen. Anschließend wurde jedes Vial dreimal vermessen. Aus den erhaltenen Daten wurden die Kalibrationsgeraden berechnet. Sauerstoff wurde zwar mittels Säule 1 des GC analysiert, jedoch gab es hierfür keine Kalibrierung, sodass die Sauerstoffkonzentration bei der Normierung der Gase auf 100 % nicht berücksichtigt werden konnte. Alle Untersuchungen der Gaszusammensetzung wurden unter Verwendung folgender Konfigurationen durchgeführt:

Säulen:	Säule 1: Molsieve 5Å, 30 m Länge x 0,53 mm Innendurchmesser x 25 µm Dicke der Säulenpackung
Säule 2:	PLOT HayeSep A, 15 m Länge x 0,53 mm Innendurchmesser x 20 µm Dicke der Säulenpackung,
Detektion:	Wasserstoff, Sauerstoff, Stickstoff, Methan mit Säule 1 Kohlenstoffdioxid mit Säule 2
Trärgas:	Argon
Detektor:	thermischer Leitfähigkeitsdetektor
Injektionsvolumen:	200 µL

#### Analyse der Flüssigphase mit Hilfe der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (engl. HPLC)

Für die Analyse der Flüssigphase der Kulturen wurde mit der Hungatemethode pro Kultur 1 mL für die HPLC-Analyse entnommen und in ein 2 mL-Reaktionsgefäß überführt. Die Reaktionsgefäße wurden anschließend bei 4 °C für 10 min und 20,817 g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bei -20 °C eingefroren. Am Tag der HPLC-Messung wurde die zu untersuchende Probe aufgetaut, geschüttelt und erneut bei 4 °C für 20 min und 20,817 g zentrifugiert. Von diesem Überstand wurden 150 µl in den Einsatz eines HPLC-Vials pipettiert.

Mittels HPLC wurden Ethanol, Glukose und folgende organische Säuren quantifiziert: Milchsäure, Ameisensäure, Essigsäure, Propionsäure, Isobuttersäure, Buttersäure,

Isovaleriansäure und Valeriansäure. Die Ofentemperatur der HPLC betrug 60 °C, das Injektionsvolumen 20 µL und als Laufmittel diente eine 5 mM Schwefelsäure. Die Auftrennung erfolgte an einer Hi-Plex H Säule (300 mm x 7,7, mm, Agilent Technologies). Die Flussrate betrug 0,6 mL/min und die Laufzeit einer Probe 40 min. Mit einem Brechungsindexdetektor wurden die Einzelkomponenten am Ende des chromatographischen Trennverfahrens nachgewiesen und mit Hilfe der Kalibration erfolgte die Umrechnung in mg/L. Die Kalibration erfolgte für alle Substanzen, außer Ethanol, als Mischstandard, wobei 13 verschiedene Konzentrationen vermessen wurden.

### Visuelle Beobachtung und Dokumentation der Kulturflaschen

Für die Beurteilung des Weizenstrohabbaus und des Wachstums der Mikroorganismen wurden wöchentlich die Farbe und die Trübung des Mediums sowie die Farbe und die Abbauerscheinungen des Weizenstrohs notiert. Somit wurden die Kulturen über die gesamte Inkubationszeit visuell verfolgt. Für die Dokumentation des Aussehens der einzelnen Kulturen wurden ebenfalls wöchentlich Photographien erstellt.

### Bestimmung der Gesamtzellzahl

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer. Diese enthielt zwei getrennte Zählfelder, welche jeweils aus 10 Kleinquadraten mit je 40 Kleinstquadraten bestanden. Die Fläche eines Kleinstquadrates betrug 0,0025 mm<sup>2</sup> und die Kammertiefe betrug 0,2 mm. Daraus resultierte ein Volumen von 0,0005 mm<sup>3</sup> pro Kleinstquadrat. Mit Hilfe der Hungatetechnik wurden 100 µl aus den Kulturflaschen entnommen und, wenn notwendig, eine Verdünnung mit steriler 0,9 %iger Natriumchloridlösung von 1:10 bzw. 1:100 angefertigt. Die Probe bzw. die Verdünnung wurde bei aufgelegtem Deckglas seitlich in die Thoma-Zählkammer überführt. Pro Zählfeld wurden jeweils 20 Kleinstquadrate ausgezählt. Die Gesamtzellzahl wurde mit Hilfe der Formel 3 berechnet:

[Formel 3]

$$\text{MO pro mL Ausgangssuspension} = \left( \frac{X_{\text{MO}}}{X_{\text{C-Quadrat}}} \right) * (2 * 10^7) \frac{1}{\text{mL}} * \text{VF}$$

$X_{\text{MO}}$  = Anzahl der ausgezählten MO/Kleinquadrat

$X_{\text{C-Quadrat}}$  = Anzahl der ausgezählten C-Quadrate

VF = Verdünnungsfaktor

## 3.2 Abschätzung der Zellzahl verschiedener Mikroorganismengruppen in Biogasreaktoren mittels der MPN-Methode

### 3.2.1 Verwendete Materialien

#### 3.2.1.1 Reaktorproben

Für die Quantifizierung der Mikroorganismengruppen der Eisenoxidierer, sowie der Eisen- und Sulfatreduzierer in Biogasreaktoren mittels der MPN-Methode wurden drei Reaktoren im Labormaßstab ausgewählt und jeweils eine Probe aus dem Reaktorablauf entnommen. Der erste Reaktor (Reaktor 4.1, Anlage 4) erhielt einmal täglich Schlempe, ein Nebenprodukt der Destillation von Ethanol, als Substrat. Dieser Reaktor wurde ausgewählt, da er aufgrund der proteinreichen Schlempe einen erhöhten Gehalt an Schwefel sowie an Eisen, in Form von FerroSorp® zur Bindung von Schwefelwasserstoff, aufwies. Der zweite Reaktor (Reaktor 4.12, Anlage 4) enthielt Schlempe und Stroh als Substrat, wurde aber ohne den Zusatz Ferrosorp® gefahren. Dieser Reaktor wurde als Vergleichsreaktor zum vorherigen Reaktor gewählt, da dieser neben Schlempe auch Stroh, aber kein FerroSorp® enthielt. Der dritte Reaktor (Reaktor 3.1, Anlage 4) enthielt Hühnertrockenkot und wurde als Vergleichsreaktor zu den beiden vorherigen Reaktoren gewählt, da dieser ein vollkommen anderes Substrat erhielt und somit eine komplett andere Zusammensetzung aufwies.

#### 3.2.1.2 Zusammensetzung des Mediums und verwendete Lösungen für das Medium

Als Grundlage für die drei selektiven Wachstumsmedien in den MPN-Platten wurde ein Süßwassermedium nach Widdel und Bak [1992] verwendet. Zu diesem Süßwassermedium wurden nach dem Autoklavieren weitere Zusätze zugegeben, welche ebenfalls nachfolgend aufgeführt sind.

- **Grundmedium Süßwassermedium nach Widdel und Bak [1992]**

NaCl	1,0 g
MgCl <sub>2</sub> * 6 H <sub>2</sub> O	0,4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
NH <sub>4</sub> Cl	0,25 g
KCl	0,5 g
CaCl <sub>2</sub> * 2 H <sub>2</sub> O	0,15 g
Resazurin	0,4 mg

oxisches A. dest      ad. 940 mL

Das Grundmedium wurde aus der Nährbodenküche des Departments Umweltmikrobiologie des Helmholtz-Zentrums für Umweltforschung - UFZ in Leipzig bezogen. Das Grundmedium wurde anoxisch in verschiedene Kulturflaschen (siehe Kap. 3.2.1.1) aufgeteilt, mit Butylgummistopfen und Aluminiumringen verschlossen und anschließend 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert.

- **Natriumhydrogencarbonat-Lösung**

NaHCO<sub>3</sub>                      2,52 g  
anox. Reinstwasser      30 mL

Diese Natriumhydrogencarbonatlösung (84 g/L) wurde in der Anaerobbox hergestellt und anschließend 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert.

- **Cystein-HCl-Monohydratlösung**

Die Herstellung dieser Lösung (30 g/L) ist dem Kap. 3.1.1.2 Zusammensetzung des Mediums, verwendete Lösungen und Lignocellulosequelle, zu entnehmen.

- **Selenit-Wolframat-Lösung DSMZ 385 [URL-1]**

NaOH                              0,4 g  
Na<sub>2</sub>SeO<sub>3</sub> \* 5H<sub>2</sub>O              6 mg  
Na<sub>2</sub>WO<sub>4</sub> \* 5H<sub>2</sub>O              8 mg  
anoxisches Reinswasser      ad. 1000 mL

Diese Lösung wurde aus der Nährbodenküche des Departments Umweltmikrobiologie des Helmholtz-Zentrums für Umweltforschung - UFZ in Leipzig bezogen.

- **Spurenelementelösung SL-10 DSMZ 320 [URL-1]**

HCl (25 %)                      10 mL  
FeCl<sub>2</sub> \* 4 H<sub>2</sub>O                  1,5 g  
ZnCl<sub>2</sub>                              70 mg  
MnCl<sub>2</sub> \* 4 H<sub>2</sub>O                  100 mg  
H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>                              6 mg  
CoCl<sub>2</sub> \* 6 H<sub>2</sub>O                  190 mg  
CuCl<sub>2</sub> \* 2 H<sub>2</sub>O                  2 mg  
NiCl<sub>2</sub> \* 6 H<sub>2</sub>O                  24 mg

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$	36 mg
A. dest.	ad. 1000 mL

Die Spurenelementelösung wurde aus der Nährbodenküche des Departments Umweltmikrobiologie des Helmholtz-Zentrums für Umweltforschung - UFZ in Leipzig bezogen.

- **Vitaminlösung nach Widdel [Widdel und Pfennig, 1981]**

Biotin	10 mg
Pyridoxin-HCl	250 mg
Thiamin-Dihydrochlorid	50 mg
Nikotinsäure	100 mg
Pantothensäure ( $\text{Ca}^{2+}$ -Salz)	25 mg
Vitamin B12	50 mg
p-Aminobenzoessäure	50 mg
A. dest.	1000 mL

Die Vitaminlösung wurde ebenfalls aus der Nährbodenküche des Departments Umweltmikrobiologie des Helmholtz-Zentrums für Umweltforschung - UFZ in Leipzig bezogen.

- **Natronlauge**

für 10 M NaOH bzw. für 1 M NaOH: NaOH	20 g bzw. 2 g
oxisches Reinstwasser	50 mL

Die beiden Lösungen wurden jeweils unter oxischen Bedingungen hergestellt und anschließend in Glasflaschen bei Raumtemperatur aufbewahrt.

- **Elektronendonormix für Sulfat- und Eisen(III)-Reduzierer**

Na-Lactat	0,6 g
Na-Acetat	1,0 g
Na-Butyrat	0,6 g
Na-Propionat	0,5 g
Na-Formiat	1,7 g
anox. Reinstwasser	25 mL

Der verwendete Elektronendonormix wurde anoxisch in der Anaerobox hergestellt und in eine Kulturflasche überführt, welche mit einem Butylgummistopfen und einem

Aluminiumring verschlossen war. Anschließend wurde der Elektronendonormix 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert.

- **Elektronenakzeptor Na-Sulfat für Sulfatreduzierer**

NaSO <sub>4</sub> * 10 H <sub>2</sub> O	0,6 g
anox. Reinstwasser	10 mL

Die Herstellung des Elektronenakzeptors Na-Sulfat (200 mM) erfolgte unter anoxischen Bedingungen in der Anaerobbox. Um die Lösung zu sterilisieren wurde diese 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert.

- **Elektronenakzeptor Eisen(III)-Citrat für Eisenreduzierer**

Fe(III)-Citrat	5,3 g
Reinstwasser	30 mL

Für den Elektronenakzeptor Eisen(III)-Citrat (671 mM) wurde das Eisen(III)-Citrat in 30 mL Reinstwasser gelöst. Während des Lösungsvorgangs wurde es gleichzeitig erhitzt und für 3 min gekocht, um die Löslichkeit des Eisen(III)-Citrates zu erhöhen. Nach dem Abkühlen der Lösung wurde der pH-Wert mit Hilfe von 10 M NaOH und 1 M NaOH auf 7,0 eingestellt. Anschließend sollte die Lösung filtriert (Cellulosemischester-Membran, Porengröße 0,2 µm) werden, damit Ablagerungen, die während des Abkühlens oder der pH-Wert-Einstellung entstanden, abgetrennt werden konnten. Dieser Filtriervorgang wurde allerdings abgebrochen, da sich der Filter aufgrund der partikelreichen Lösung sofort zusetzte. Die Eisen(III)-Citratlösung wurde anschließend unfiltriert verwendet. Die Lösung wurde 15 min und der Gasraum 1 min mit Stickstoff begast, um vorhandenen Restsauerstoff zu entfernen. Die Sterilisation der Lösung erfolgte durch das Autoklavieren für 20 min bei 121 °C und 2 bar. Mit Hilfe der Eisentests für Fe<sup>2+</sup> (gelöstes zweiwertiges Eisen) und Fe<sub>tot</sub> (totaler Eisengehalt) (siehe Kap. 3.2.1.6) wurden ein Eisengesamtgehalt von 3431 µM und eine Konzentration von 3042 µM Fe<sup>2+</sup> bestimmt.

- **Elektronendonor Fe(II)chlorid für Eisen(II)oxidierer**

FeCl <sub>2</sub>	1,98 g
anox. Reinstwasser	10 mL

Die anoxische Lösung (10 mM) wurde wie oben beschrieben (siehe Cystein-Monohydratlösung im Kapitel 3.1.1.2 Zusammensetzung des Mediums, verwendete Lösungen und Lignocellulosequelle) mit einem Spritzenvorsatzfilter in der Anaerobbox steril filtriert.

- **Elektronenakzeptor Na-Nitrat für Eisen(II)oxidierer**

NaNO <sub>3</sub>	0,8 g
anox. Reinstwasser	25 mL

Die Herstellung einer 400 mM Na-Nitratlösung erfolgte unter anoxischen Bedingungen in der Anaerobbox. Die Lösung wurde anschließend in eine Kulturflasche überführt und 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert.

- **Elektronenakzeptor Na-Acetat für Eisen(II)oxidierer**

C <sub>2</sub> H <sub>3</sub> NaO <sub>2</sub>	0,1 g
anox. Reinstwasser	50 mL

Die Na-Acetatlösung (25 mM) wurde in der Anaerobbox hergestellt und danach 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert.

- **Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS-Puffer) zur Bestimmung der Gesamtzellzahl**

Dinatriumhydrogenphosphat	1,4 g
Natriumchlorid	0,8 g
Kaliumchlorid	0,2 g
Kaliumdihydrogenphosphat	0,27 g
A. dest	ad. 1000 mL

Der PBS-Puffer wurde aus der Nährbodenküche des Departments Umweltmikrobiologie des Helmholtz-Zentrums für Umweltforschung - UFZ in Leipzig bezogen.

### 3.1.1.3 Verwendete Lösungen für die photometrischen Tests

- **Natriumsulfidlösung für den Sulfidtest [Cline und Broenkow, 1969]**

Na <sub>2</sub> S * 9H <sub>2</sub> O	2,1 g
NaOH	1,1 g
anox. Reinstwasser	250 mL

Zur Herstellung von Sulfidstandards für die Kalibrationsgerade wurde eine Natriumsulfidlösung verwendet. Dafür wurden das Natriumhydroxid und das Natriumsulfid-Nonahydrat in der Anaerobbox in anoxischem Reinstwasser gelöst. Die Lösung wurde anschließend in eine Kulturflasche gefüllt, welche mit einem Butylgummistopfen und einem Aluminiumring verschlossen wurde.

- **Zinkacetatlösung für den Sulfidtest [Cline und Broenkow, 1969]**

$\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_2\text{Zn} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3,5 g
oxisches VE-Wasser	100 mL

Die Herstellung der 3%igen Zinkacetatlösung erfolgte unter oxischen Bedingungen. Die Lösung wurde anschließend in einer Glasflasche aufbewahrt.

- **Sulfidreagenz für den Sulfidtest [Cline und Broenkow, 1969]**

N,N-Dimethyl-p-Phenylendiammonium-Dichlorid (DMPD)	1,0 g
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,5 g
HCl (25 %)	50 mL

Für die Herstellung der Sulfidreagenz wurde N,N-Dimethyl-p-Phenylendiammonium-Dichlorid (DMPD) und Eisen(III)-chlorid-Hexahydrat in 25%iger HCl gelöst. Anschließend wurde die Lösung in eine Glasflasche überführt, mit Alufolie umwickelt und im Kühlschrank aufbewahrt. Die Lösung war stark sauer und karzinogen.

- **Salzsäure für den Eisentest**

für 1M HCl bzw. für 0,5 M HCl: HCl (37 %)	4 mL bzw. 2 mL
oxisches Reinstwasser	46 mL bzw. 48 mL

Die Herstellung der 1 M bzw. 0,5 M HCl-Lösung erfolgte unter einem Abzug. Die Flaschen wurden jeweils 5 min mit Stickstoff begast, um den vorhandenen Sauerstoff im Gasraum auszutauschen und bei 121 °C und 2 bar für 20 min autoklaviert.

- **Fe(II)chlorid-HAHCl-Lösung für den Eisentest**

$\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$	2,0 g
Hydroxylammoniumhydrochlorid (HAHCl)-Lösung (siehe unten)	100 mL

Zur Herstellung der Eisen(II)standards für die Kalibrationsgeraden der  $\text{Fe}^{2+}$ - und  $\text{Fe}_{\text{tot}}$ -Tests wurde eine Eisen(II)chlorid-HAHCl-Lösung (100 mM) verwendet. Dafür wurde das Eisen(II)chlorid-Tetrahydrat in HAHCL gelöst. Die Lösung wurde anschließend in eine Kulturflasche gefüllt, welche mit einem Butylgummistopfen und einem Aluminiumring verschlossen wurde.



- **Hydroxylammoniumhydrochlorid (HAHCl)-Lösung**

HAHCl	15 g
1 M HCl	150 mL

Die HAHCl-Lösung (100 g/L) wurde unter oxischen Bedingungen hergestellt, anschließend in eine Glasflasche überführt, welche mit Alufolie umwickelt wurde. Die Lösung wurde bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt.

- **Ammoniumacetat mit Ferrozin**

CH <sub>3</sub> COONH <sub>4</sub>	50 g
oxisches Reinstwasser	100 mL
C <sub>20</sub> H <sub>13</sub> N <sub>4</sub> O <sub>6</sub> S <sub>2</sub> Na	0,1 g

Für die Herstellung der Ammoniumacetatlösung (500 g/L) mit Ferrozin (1 g/L) wurde zunächst Ammoniumacetat in oxischem Reinstwasser gelöst. Anschließend wurde das Ferrozin hinzugegeben, sodass eine zähflüssige, leicht gelbe Flüssigkeit entstand, welche in einer Glasflasche im Dunkeln bei 4 °C im Kühlschrank aufbewahrt wurde.

### **3.2.1.4 Chemikalien, Geräte, Materialien**

Eine Auflistung der verwendeten Chemikalien, Geräte und Materialien ist der Anlage 3 zu entnehmen.

## **3.2.2 Methoden**

### **3.2.1.1 Vorbereitungen des Mediums und der MPN-Platten**

Als Grundlage für die drei selektiven Wachstumsmedien in den MPN-Platten wurde ein Süßwassermedium nach Widdel und Bak [1992] verwendet. Das Grundmedium wurde anoxisch in neun 100 mL-Kulturflaschen mit jeweils 94 mL Medium und in 36 20 mL-Kulturflaschen mit jeweils 9 mL Medium aufgeteilt. Die Kulturflaschen wurden mit Butylgummistopfen und Aluminiumringen verschlossen und anschließend 20 min bei 121 °C und 2 bar autoklaviert. Die neun 100 mL-Kulturflaschen dienten als Grundlage für die drei selektiven Wachstumsmedien und die 36 20 mL-Kulturflaschen wurden für die Verdünnungsreihen der drei Reaktorabläufe benötigt. Sowohl die Erstellung der Verdünnungsreihen als auch die Zugabe der Mediumzusätze bzw. der Elektronenakzeptoren und -donoren erfolgte nach der Hungatemethode mit Hilfe von sterilen, mit Stickstoff gespülten Spritzen und Kanülen unter der Sterilbank

[Hungate, 1969]. Dem Grundmedium in den großen Kulturflaschen wurden nach dem Autoklavieren pro Flasche 3 mL  $\text{NaHCO}_3$ , 0,1 mL Spurenelemente-, 0,1 mL Selenit-Wolframat-, 0,1 mL Vitamin- sowie 0,6 mL Cystein-HCl-Monohydratlösung hinzugegeben. Nachfolgend sind die dem Grundmedium mit Zusätzen zugegebenen Elektronendonoren bzw. -akzeptoren dargestellt (Tabelle 1).

**Tabelle 1 Zugegebene Elektronendonoren und -akzeptoren zur Erstellung der selektiven Wachstumsmedien für die MPN-Platten** Die dargestellten Elektronendonoren und -akzeptoren wurden zum Grundmedium mit Zusätzen, die nach dem Autoklavieren zugegeben wurden, hinzugefügt, um selektive Wachstumsmedien zur Quantifizierung von Eisenreduzierern, Eisenoxidierern und Sulfatreduzierern mittels MPN-Methode zu erhalten. Hinter den jeweils zugegebenen Volumina steht die Endkonzentration.

Selektives Wachstumsmedium	Zugegebene Lösungen		Endkonzentration
Eisenreduzierer	Elektronendonormix:	1 ml	
	Na-Acetat		5 mM
	Na-Lactat		2 mM
	Na-Butyrat		2 mM
	Na-Propionat		2 mM
	Na-Formiat		10 mM
	Fe(III)-Citratlösung (Elektronenakzeptor)	2,2 mL	15 mM
Sulfatreduzierer	Elektronendonormix: (siehe oben)	1 mL	
	Na-Sulfatlösung (Elektronenakzeptor)	1 mL	2 mM
Eisenoxidierer	Eisen(II)chloridlösung (Elektronendonor)	1 mL	10 mM
		1 mL	0,25 mM
	Na-Acetatlösung (Elektronendonor)	1 mL	4 mM
	Na-Nitratlösung (Elektronenakzeptor)		

Zunächst wurden für das Medium der MPN-Platten der Eisenoxidierer, sowie für das Medium der Eisen- und Sulfatreduzierer, der Elektronendonor und die jeweiligen Elektronenakzeptoren hinzugegeben. Nach der Zugabe der Fe(II)chlorid-Lösung in das Eisenoxidierermedium entstand ein weißer Niederschlag in der Kulturflasche, wobei es sich wahrscheinlich um Eisenkarbonate bzw. -phosphate handelte. Anschließend wurde der pH-Wert aller Medien in den neun Kulturflaschen mit 1 M HCl auf 7,0 eingestellt.

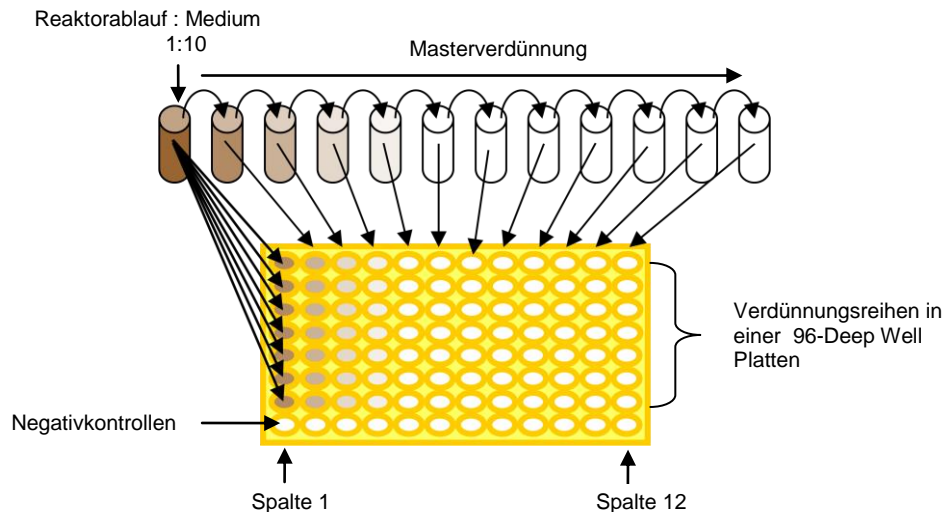
Der nächste Schritt zur Vorbereitung der MPN-Platten war die Anfertigung von drei Masterverdünnungsreihen. Von den drei Reaktorabläufen wurde jeweils eine Masterverdünnungsreihe mit zwölf Verdünnungen hergestellt. Für die Herstellung der jeweils ersten Verdünnung wurde eine Spritze ohne Kanüle verwendet, da die Reaktorproben sehr inhomogen und zähflüssig waren. Dazu wurde der Butylgummistopfen der ersten 20 mL-Kulturflasche entfernt und mittels steriler Spritze

1 mL Reaktorprobe zu den vorgelegten 9 mL Grundmedium hinzugegeben. Der Gasraum der Kulturflasche wurde 1 min mit Stickstoff begast, bevor diese wieder mit einem sterilen Butylgummistopfen verschlossen wurde. Aus dieser Kulturflasche wurde wiederum 1 mL entnommen und in die nächste 20 mL-Kulturflasche überführt. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis zwölf Verdünnungen jeder Reaktorprobe hergestellt waren.

Zur Bestimmung der Most Probable Number von Eisenoxidierern, sowie Eisen- und Sulfatreduzierern in den Reaktorproben wurden aus den drei Masterverdünnungen weitere Verdünnungsreihen in den verschiedenen selektiven Wachstumsmedien in der Anaerobbox hergestellt. Hierzu wurden 96-Deep Well Platten verwendet. Diese bestanden aus Polypropylen, besaßen 96 Vertiefungen mit einem Fassungsvermögen von 1,2 mL und waren in 8 Zeilen und 12 Spalten aufgeteilt. Zur Vorbereitung wurden neun MPN-Platten und neun Reagenzreservoirs mit Deckel (Anlage 5), ebenfalls aus Polypropylen, über Nacht in VE-Wasser eingelegt. Anschließend wurden die Platten und die Reservoirs gründlich mit VE-Wasser gespült, autoklaviert (20 min, 121°C, 2 bar) und zwei Tage im Trockenschrank bei 60 °C gelagert. Danach wurden die MPN-Platten und die Reservoirs zwei Tage vor Benutzung in die Anaerobbox eingeschleust, damit unerwünschter Sauerstoff aus den Platten und den Reagenzreservoirs hinaus diffundieren konnte.

### **3.2.1.2 Ansetzen der MPN-Platten**

Das Ansetzen der MPN-Platten erfolgte in der Anaerobbox. Das erste selektive Wachstumsmedium wurde in ein Reagenzreservoir gekippt und anschließend mit einer Multipipette 900 µL Medium in jedes Well der MPN-Platte pipettiert. Dieser Vorgang wurde so oft wiederholt, bis eine der Platten das Medium mit Na-Sulfat, die zweite Platte das FeCl<sub>2</sub>-Medium und die dritte Platte das Eisen(III)-Citrat-Medium enthielten. Anschließend wurde zunächst die höchste Verdünnung in ein weiteres Reagenzreservoir gekippt und mit der Multipipette 100 µL der Verdünnung in die Wells der Spalte 12 pipettiert. Die restliche Verdünnung wurde verworfen und die zweithöchste Verdünnung in das Reservoir gekippt. Von dieser Verdünnung wurden 100 µL in die Wells der Spalte 11 pipettiert. Dieser Vorgang wurde solange durchgeführt, bis jede Spalte (1-12) der MPN-Platte mit einer der zwölf Verdünnungen inokuliert war. In die letzte Zeile (H) der Platte wurde keine verdünnte Probe pipettiert, da diese Wells die Negativkontrollen darstellten. Der gesamte Ablauf ist in Abbildung 4 dargestellt.



**Abbildung 4 Ansetzen der MPN-Platten** Dargestellt ist die Masterverdünnungsreihe sowie die Verdünnungsreihen in einer 96-Deep Well Platte, welche für die Anreicherung von Mikroorganismen aus den Reaktoren benötigt wurden. Die letzte Reihe der Platte wurde nicht inokuliert und diente als Negativkontrolle.

Für die Verdünnungsreihe der zweiten und dritten Reaktorprobe wurde jeweils der gesamte Ablauf wiederholt. Somit ergaben sich für die drei Reaktorabläufe jeweils drei Platten mit drei unterschiedlichen selektiven Wachstumsmedien. Anschließend wurden alle Platten mit einer durchsichtigen sterilen Klebefolie verschlossen, zusammen mit einem Teststreifen zum Nachweis eines anaeroben Milieus und einem feuchten Gasgeneratorbeutel in einem Plastikbeutel luftdicht verschlossen. Der Gasgeneratorbeutel diente zur Sauerstofffixierung, und erzeugte gleichzeitig eine Kohlenstoffdioxidatmosphäre. Die Platten wurden sechs Wochen bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit wurden die MPN-Platten wöchentlich optisch ausgewertet (Anlage 6).

### 3.2.1.3 optische Auswertungen

Während der gesamten Inkubationszeit erfolgten wöchentlich optische Auswertungen aller MPN-Platten der Eisenoxidierer sowie Sulfat- und Eisenreduzierer. Dabei wurden Wells, welche sich dunkel verfärbt hatten, als positiv gewertet. Zusätzlich wurden von allen Platten einmal wöchentlich Fotografien erstellt (Anlage 6).

### 3.2.1.4 Bestimmung des Nitratgehaltes

Für die Bestimmung des Nitratgehaltes in den Reaktorproben zu Beginn der Inkubationszeit wurden halbquantitative Teststäbchen für Nitrat und Nitrit verwendet. Dieser Test wurde am Ende der Inkubationszeit ebenfalls für die MPN-Platten mit dem

Eisenoxidiermedium durchgeführt, da in diesen Platten Na-Nitratlösung als Elektronenakzeptor verwendet wurde. Mit den Teststäbchen konnten Nitratkonzentrationen im Bereich von 0 mg/l bis 250 mg/l und Nitritkonzentrationen im Bereich von 0 mg/l bis 80 mg/l erfasst werden. Um den Nitrat- und Nitritgehalt der Reaktorabläufe, welche auch für die Verdünnungsreihe verwendet wurden, zu bestimmen, wurde 200 µL Probe entnommen und direkt auf ein Teststäbchen pipettiert. Für die Bestimmung des Nitratgehaltes wurden die MPN-Platten in der Anaerobbox geöffnet, aus jedem Well 100 µl Probe entnommen und auf ein Teststäbchen pipettiert. Die MPN-Platten wurden nach dem Test wieder verschlossen und in den Brutschrank zurückgestellt. Wenn sich das Nitrattestfeld verfärbte und das Testfeld für Nitrit weiß blieb, konnte anhand des vorgegebenen Farbschemas auf der Verpackung die Nitratkonzentration bestimmt werden. Wenn sowohl im Nitrat- als auch im Nitrittestfeld keine Verfärbung stattfand, konnte keine Nitrat- bzw. Nitritkonzentration detektiert werden.

### **3.2.1.5 Bestimmung des Sulfidgehaltes**

Zusätzlich zur optischen Auswertung der MPN-Platten mit dem Sulfatreduziermedium erfolgte in Woche 6 die Auswertung mittels eines photometrischen Tests nach Cline [Cline und Broenkow, 1969]. Als Standardlösung diente eine 35 mM Natriumsulfidlösung. Von dieser Stammlösung wurden acht Verdünnungen zwischen 5 mM und 0,15 mM mit anoxischem Reinstwasser hergestellt. Dafür wurde zunächst anoxisches Reinstwasser in der Anaerobbox in acht Kulturflaschen vorgelegt, welche mit einem Butylgummistopfen und einem Aluminiumring verschlossen wurden. Die Fertigstellung der Standardverdünnungen erfolgte in der Sterilbank mit Hilfe der Hungatemethode [Hungate, 1969]. Für den photometrischen Test zur Erstellung der Kalibrationsgeraden wurden zunächst 1 mL Zinkacetat-Lösung und 4 mL VE-Wasser in Reagenzgläser vorgelegt. Dies diente dazu das Sulfid zu stabilisieren. Anschließend wurden 100 µL von jedem Standard und 400 µL Sulfidreagenz in die Reagenzgläser pipettiert. Die Proben wurden gevortext und 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde die Absorption der Standards bei 670 nm gemessen. Als Nullprobe diente dabei eine Lösung mit 1 mL Zinkacetat-Lösung, 4 mL VE-Wasser und 400 µL Sulfidreagenz. Nach der Erstellung der Kalibrationsgerade (Anlage 7) wurden die drei Reaktorproben und die MPN-Platten, welche das Sulfatreduziermedium enthielten, auf gleiche Weise getestet. Dafür wurden 100 µL Probe aus einem frischen Reaktorablauf, welcher auch für die Herstellung der Verdünnungsreihe für die MPN-Platten diente, entnommen. Die MPN-Platten wurden unter der Sterilbank geöffnet und 100 µL Probe je Well entnommen. Anschließend wurden die MPN-Platten nach dem Test wieder verschlossen und in den Brutschrank

zurückgestellt. Die Konzentrationen wurden mit Hilfe der Sulfidkalibrationsgerade ausgerechnet. Um bei der chemischen Analyse eine Sulfidkonzentration festzulegen, ab dem ein Well als positiv galt, wurde der Durchschnitt der Negativkontrollen berechnet und verdoppelt. Jedes Well, welches eine Sulfidkonzentration oberhalb dieses Wertes aufwies, wurde als positiv gewertet.

### 3.2.1.6 Bestimmung von $\text{Fe}^{2+}$ , $\text{Fe}^{3+}$ und $\text{Fe}_{\text{tot}}$

Zusätzlich zu den wöchentlichen optischen Beobachtungen der MPN-Platten mit dem Eisenreduzierermedium und -oxidierermedium wurde die  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration und der Gesamteisengehalt ( $\text{Fe}_{\text{tot}}$ ) in der sechsten Woche photometrisch nach Stookey [1970] bestimmt. Als Stammlösung für die Standards wurde eine 100 mM  $\text{FeCl}_2$ -HAHCl-Lösung verwendet. Von dieser Stammlösung wurden zehn verschiedenen Verdünnungen zwischen 5 mM und 0,01 mM mit 1 M HCl angefertigt und für die Erstellung der Kalibrationsgeraden ( $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Fe}_{\text{tot}}$ ) genutzt (Anlage 8). Für die photometrische Bestimmung der Proben der MPN-Platten wurden die Platten in der Anaerobbox geöffnet und 100  $\mu\text{L}$  Probe pro Well 1:5 mit 1 M HCl verdünnt. Da  $\text{Fe}^{2+}$  bei neutralem pH-Wert leicht oxidiert, wurden die Proben so durch den niedrigen pH-Wert stabilisiert. Die MPN-Platten wurden nach dem Test wieder verschlossen und in den Brutschrank zurückgestellt. Für die Bestimmung der  $\text{Fe}_{\text{tot}}$ -Konzentration der Standards und der einzelnen verdünnten Proben aus den drei MPN-Platten wurden in 2 mL-Reaktionsgefäße 100  $\mu\text{L}$  HAHCl und 100  $\mu\text{L}$  des jeweiligen Standards oder der Probe vermischt. Die Lösung wurde 30 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert, bevor 200  $\mu\text{L}$  der Ammoniumacetat-Ferrozinlösung dazu pipettiert wurden. Anschließend wurde die Lösung nochmals 5 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption bei 562 nm gemessen. Für die Bestimmung der  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration wurden 100  $\mu\text{L}$  1 M HCl, 100  $\mu\text{L}$  des jeweiligen Standards bzw. der verdünnten Proben aus den drei MPN-Platten und 200  $\mu\text{L}$  Ammoniumacetat-Ferrozinlösung in 2 mL-Reaktionsgefäße pipettiert. Anschließend wurde die Lösung für 5 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert und die Absorption bei 562 nm gemessen.

Um für die Platten mit dem Eisenreduzierermedium einen  $\text{Fe}^{2+}$ -Wert festzulegen, ab dem ein Well als positiv galt, wurde anschließend der Durchschnitt der  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration der Negativkontrollen berechnet und verdoppelt. Jedes Well, welches eine  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration oberhalb dieses Wertes besaß, wurde als positiv anerkannt. Für die Auswertung der MPN-Platten mit dem Eisenoxidierermedium wurde zunächst der Durchschnitt des  $\text{Fe}_{\text{tot}}$ -Gehaltes für alle Wells einer Platte berechnet. Anschließend wurde von diesem Durchschnittswert die jeweilige  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration eines Wells subtrahiert, um die

$\text{Fe}^{3+}$ -Konzentration dieses Wells zu erhalten [Benz et al, 1998]. Jedes Well, welches eine  $\text{Fe}^{3+}$ -Konzentration oberhalb der Negativkontrollen besaß wurde als positiv bewertet.

Für die Bestimmung des gelösten und schwach kristallinen zweiwertigen und dreiwertigen Eisens in den drei Reaktorproben, welche ebenfalls für die Herstellung der Verdünnungsreihen für die MPN-Platten genutzt wurden, wurde eine 0,5 M HCl Extraktion durchgeführt. Dazu wurde jeweils eine 1:50-Verdünnung von den drei Reaktorproben mit 0,5 M HCL hergestellt. Die Verdünnungen wurden auf einem Horizontalschüttler (150 rpm) bei Raumtemperatur inkubiert und nach 24 h 1 mL Probe entnommen. Die entnommenen Proben wurden zentrifugiert (20,817 g, 10 min) und sowohl die  $\text{Fe}^{2+}$ - als auch die  $\text{Fe}_{\text{tot}}$ -Konzentration des Überstandes, wie oben beschrieben, bestimmt. Anschließend wurden die Konzentrationen anhand von Kalibrationsgeraden ausgerechnet und anschließend auf die Frischmasse bezogen.

### 3.2.1.7 Bestimmung der Gesamtzellzahl der Reaktorproben

Für die Bestimmung der Gesamtzellzahl der drei Reaktorproben wurden die gleichen Proben verwendet, aus der auch die jeweiligen Verdünnungsreihen für die MPN-Platten hergestellt wurden. Die Proben wurden jeweils 1:1000 mit PBS-Puffer verdünnt. Das Auszählen erfolgte anschließend unter dem Mikroskop mit Hilfe einer Thoma-Zählkammer wie im Kap. 3.1.2.2 Kultivierungsbegleitende Analysen beschrieben.

### 3.2.1.8 MPN-Methode und MPN-Programm

Die MPN-Methode lieferte mit Hilfe von statistischen Formeln einen Schätzwert der Ausgangszellzahl der betrachteten metabolischen Mikroorganismengruppen in den drei Reaktoren zu dem Zeitpunkt, als die MPN-Platten angesetzt wurden. Andererseits beruht die Methode auf dem Wachstum und der Kultivierbarkeit der Mikroorganismen, sodass sich die berechnete Ausgangszellzahl (MPN) während der gesamten Inkubationszeit veränderte und man somit davon ausgehen kann, dass nicht alle Mikroorganismen einer Gruppe erfasst wurden. Da für die Anwendung der MPN-Methode mehrere Parallelansätze benötigt wurden, wurden jeweils sieben Parallelen einer Verdünnungsreihe, bestehend aus 12 Verdünnungen, in 96-Deep Well Platten angesetzt. Aus der Häufigkeit der positiven Ansätze wurde die wahrscheinlichste Zellzahl (Most Probable Number) einer Probe mit gewissen Fehlergrenzen (Konfidenzintervall von 95 %) berechnet. Um die Berechnung für die MPN-Platten durchzuführen, wurde das MPN-Programm von Albert J. Klee in der Version 4.04 [Klee, 1993] verwendet. Das Programm gab die Anzahl der geschätzten Zellen/mL, sowie das obere als auch das

untere 95%-Konfidenzintervall in Zellen/mL in einer Textdatei aus. Dabei wurden die korrigierten Werte nach Salama et al. [1978] verwendet. Diese Werte wurden auf die Trockensubstanz der drei Reaktorabläufe bezogen und in Zellen/g Trockensubstanz (TS) umgerechnet.



## 4 Ergebnisse

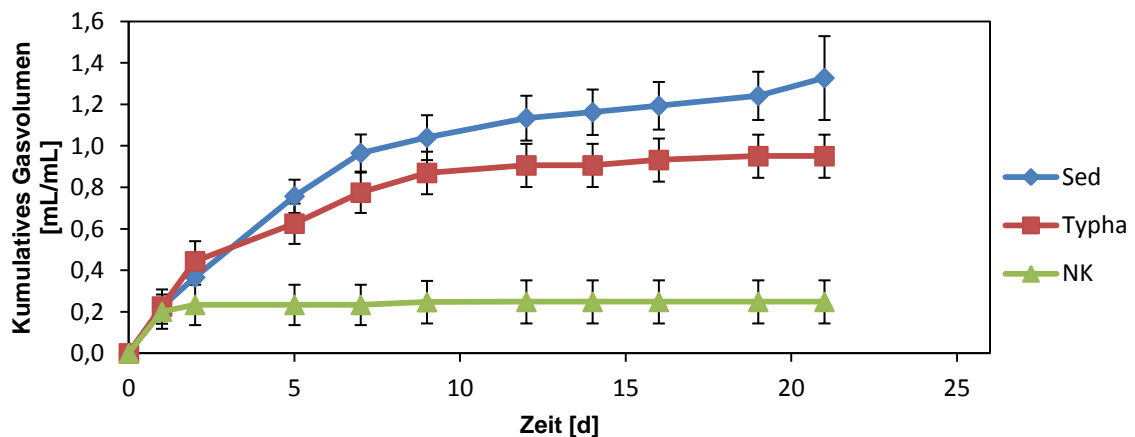
Im Rahmen dieser Arbeit wurden einerseits anaerobe, thermophile, lignocelluloseverwertende Mikroorganismen aus dem ungarischen Thermalsee Héviz angereichert. Die Kultivierung der Mikroorganismen erfolgte bei 55 °C in anoxischem Flüssigmedium mit Weizenstroh als Substrat und wurde durch verschiedene analytische Methoden detailliert begleitet. Andererseits wurde die Zellzahl von Eisenoxidierern, sowie Eisen- und Sulfatreduzierern mittels der MPN-Methode in drei verschiedenen Laborreaktoren abgeschätzt. In diesem Kapitel werden zunächst die Ergebnisse für die Kultivierung der lignocellulolytischen Mikroorganismen dargestellt und anschließend die Ergebnisse der Zellzahlabeschätzung von Eisenoxidierern, sowie von Eisen- und Sulfatreduzierern vorgestellt.

### 4.1 Anreicherung lignocellulolytischer Mikroorganismen aus dem Seesediment eines Thermalsees

Für die Anreicherung von lignocelluloseverwertenden Mikroorganismen wurden aus zwei Seesedimentproben des Thermalsees Héviz zwei Anreicherungskulturen angesetzt und ein 1. Transfer dieser Kulturen durchgeführt. Somit ergaben sich für die Anreicherungskulturen und für den 1. Transfer jeweils zwei Kulturen aus der Probe, welche aus dem Sediment der Bodenregion in Seemitte stammte (Sediment A und B) und jeweils zwei Kulturen aus der Probe, welche aus dem Sediment aus der Umgebung in Ufernähe stammte (Typha A und B).

Sowohl für die Anreicherungskulturen als auch für den 1. Transfer wurde während der gesamten Inkubationszeit das Gasvolumen mit Hilfe eines horizontalen U-Rohrs bestimmt.

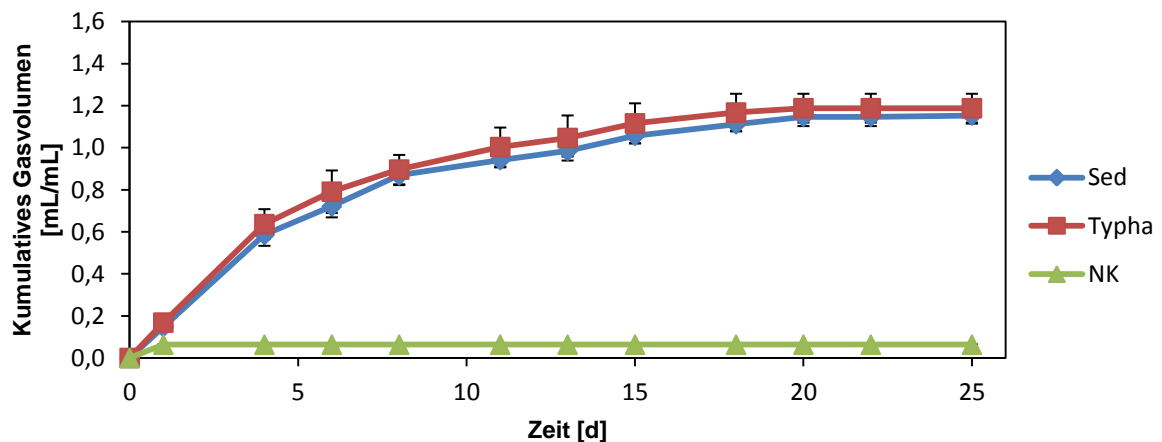
Abbildung 5 zeigt das kumulative Gasvolumens der Anreicherungskulturen in Norm- $\text{mL}_{\text{Gas}}/\text{mL}_{\text{Flüssigkeit}}$  (kurz:  $\text{mL}/\text{mL}$ ) über den Versuchszeitraum von 21 Tagen.



**Abbildung 5 Kumulatives Gasvolumen der Anreicherungskulturen Sediment (Sed) und Typha, sowie der Negativkontrollen (NK)** Dargestellt sind die Mittelwerte zweier Parallelen der Kulturen und der Kontrollen in  $\text{mL}_{\text{Gas}}/\text{mL}_{\text{Flüssigkeit}}$  ( $\text{mL}/\text{mL}$ ) über die Zeit. Die Balken stellen jeweils die Abweichungen des Mittelwertes zum Maximum bzw. Minimum der Gasproduktion der einzelnen Kulturen bzw. der Kontrollen dar.

Die kumulative Gasproduktion der Kulturen lag deutlich über der Gasproduktion der Negativkontrollen. Die Gasproduktion aller Kulturen und der Negativkontrollen nahm über die Zeit kontinuierlich ab, wobei das gebildete Gasvolumen der Sedimentkulturen insgesamt deutlich höher lag, als das der Typhakulturen. Beide Kulturen produzierten in den ersten 14 Tagen das meiste Gas (im Durchschnitt  $92,7 \pm 5,2$  % des gesamten Gasvolumens). Bei den Sedimentkulturen fällt auf, dass die Gasproduktion zwischen Tag 19 und Tag 21 noch einmal zunahm, wobei die Gasproduktion der Typhakulturen gleich blieb. Das gesamte gebildete Gasvolumen der Sedimentkulturen betrug nach 21 Tagen  $1,3 \pm 0,2$   $\text{mL}/\text{mL}$  und das kumulative Gasvolumen der Typhakulturen betrug  $0,9 \pm 0,1$   $\text{mL}/\text{mL}$ . Die Analyse der Gasproduktion der Negativkontrollen zeigte bis Tag 2 eine Gasproduktion von  $0,2 \pm 0,1$   $\text{mL}/\text{mL}$ . Anschließend wurde keine weitere Gasproduktion für die Negativkontrollen beobachtet.

Die nachfolgende Abbildung 6 zeigt das kumulative Gasvolumen des 1. Transfers während der gesamten Inkubationszeit von 25 Tagen.



**Abbildung 6 Kumulatives Gasvolumen des 1. Transfers der Sediment- (Sed) und Typhakulturen, sowie der Negativkontrollen (NK)** Dargestellt sind die Mittelwerte zweier Parallelen der Kulturen und der Kontrollen in  $\text{mL}_{\text{Gas}}/\text{mL}_{\text{Flüssigkeit}}$  ( $\text{mL}/\text{mL}$ ) über die Zeit. Die Balken stellen jeweils die Abweichungen des Mittelwertes zum Maximum bzw. Minimum der Gasproduktion der einzelnen Kulturen bzw. der Kontrollen dar. Für die NK werden keine Balken vom Mittelwert zum Minimum bzw. Maximum angezeigt, da die Parallelen sehr ähnlich waren.

Sowohl bei den Sedimentkulturen als auch bei den Typhakulturen war eine höhere Gasproduktion als bei den Negativkontrollen zu erkennen, wobei die Gasproduktion der Kulturen über die gesamte Inkubationszeit kontinuierlich abnahm. Anders als bei der ersten Anreicherung war die Gasproduktion von Sediment- und Typhakulturen während der gesamten Inkubationszeit sehr ähnlich, wobei die Typhakulturen zwischen Tag 4 und Tag 20 in diesem Transfer mehr Gas als die Sedimentkulturen (im Durchschnitt  $0,05 \text{ mL}/\text{mL}$ ) produzierten. Ab Tag 20 war die kumulative Gasproduktion der Typhakulturen und der Sedimentkulturen nahezu gleich ( $1,1 \pm 0,1 \text{ mL}/\text{mL}$ ) und veränderte sich nur noch gering bis zum Ende der Inkubationszeit (Tag 25). Beide Kulturen produzierten bis Tag 20 bereits das meiste Gas ( $99,5 \pm 0,5 \%$ ). Die gesamte kumulative Gasproduktion der Typhakulturen und der Sedimentkulturen betrug im Durchschnitt  $1,2 \pm 0,1 \text{ mL}/\text{mL}$ . Die Analyse der Negativkontrollen zeigte eine Gasproduktion von  $0,1 \pm 0,0 \text{ mL}/\text{mL}$  am ersten Tag. Während den folgenden 24 Tagen fand in den Negativkontrollen keine weitere Gasentwicklung statt.

Sowohl in der Anreicherung als auch im 1. Transfer produzierten die Kulturen deutlich mehr Gas als die Negativkontrollen. Im Vergleich zur ersten Anreicherung produzierten die Typhakulturen  $0,1 \pm 0,1 \text{ mL}/\text{mL}$  mehr Gas, während die Sedimentkulturen  $0,1 \pm 0,1 \text{ mL}/\text{mL}$  weniger Gas produzierten.

Während der gesamten Inkubationszeit wurde die Gaszusammensetzung der Anreicherungskulturen und des 1. Transfers mittels GC analysiert. In Abbildung 7 ist die Gaszusammensetzung der Anreicherungskulturen für den Tag 1, Tag 15 und Tag 21 dargestellt.

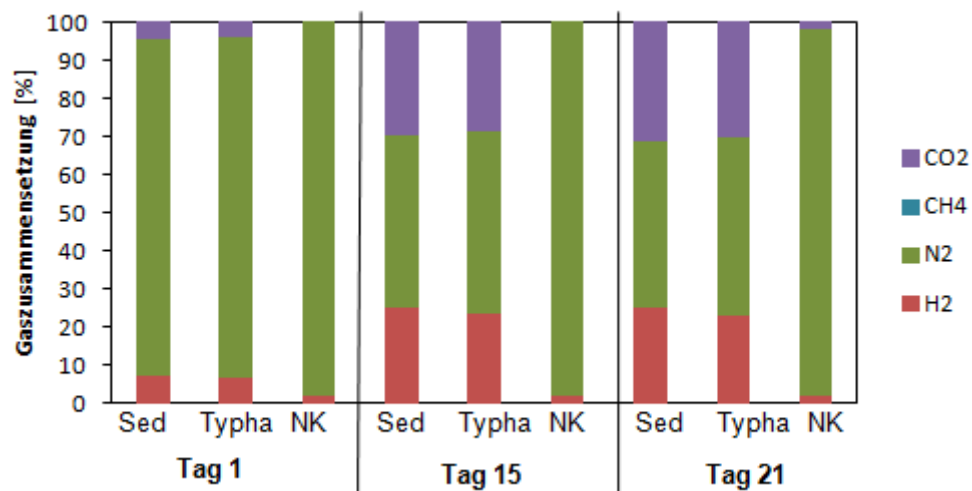


**Abbildung 7 Gaszusammensetzung der Anreicherungskulturen Sediment (Sed) und Typha, sowie der Negativkontrollen (NK)** Dargestellt sind die Mittelwerte der auf 100 % normierten Daten der Gaszusammensetzung zweier Parallelen der verschiedenen Anreicherungskulturen bzw. der Negativkontrollen.

Zu Beginn des Versuches (Tag 0) wiesen alle Ansätze die gleiche Zusammensetzung der Gasphase von ca. 98 % N<sub>2</sub> und ca. 2 % H<sub>2</sub> auf. Diese Anfangswerte entsprachen der Gaszusammensetzung der Atmosphäre in der Anaerobbox, in welcher die Kulturflaschen vorbereitet wurden. Bereits am ersten Tag lässt sich ein Unterschied zwischen den Sediment- bzw. Typhakulturen und den Negativkontrollen feststellen, da sich in den Kulturen bereits im Durchschnitt 5±0 % Kohlenstoffdioxid gebildet hatte. In den Sedimentkulturen nahm die Wasserstoffkonzentration bis Tag 15 auf 22 % zu und anschließend wieder geringfügig auf 17 % ab. Die Kohlenstoffdioxidkonzentration in den Sedimentkulturen nahm über die gesamte Inkubationszeit auf 37 % zu. In den Typhakulturen war die Wasserstoffkonzentration deutlich geringer und blieb während der gesamten Versuchszeit nahezu gleich bei ca. 5 %. Die Konzentration des Kohlenstoffdioxids war ebenfalls geringer und stieg in der ersten beiden Wochen des Versuchs auf 34 % an und nahm anschließend bis zum Ende der Inkubationszeit gering, um ca. 3 %, ab. Zusätzlich wurde in einer der beiden Typhakulturen am Tag 15 8 % Methan detektiert. In allen Kulturen führte die Bildung von Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff während der gesamten Inkubationszeit zu einer Abnahme des Stickstoffanteils. Die Gaszusammensetzung der Negativkontrollen änderte sich im Verlauf der Inkubationszeit nicht (im Durchschnitt 2±0 % Wasserstoff, 98±0 % Stickstoff). Die

Gaszusammensetzung der Anreicherungskulturen veränderte sich, einhergehend mit der Gasproduktion (Abbildung 6), vor allem innerhalb der ersten 15 Tage. Anschließend änderte sich sowohl die Gaszusammensetzung als auch die kumulative Gasproduktion nur noch geringfügig.

Für den 1.Transfer wurde ebenfalls über die gesamte Inkubationszeit eine Analyse der Gaszusammensetzung durchgeführt (Abbildung 8).



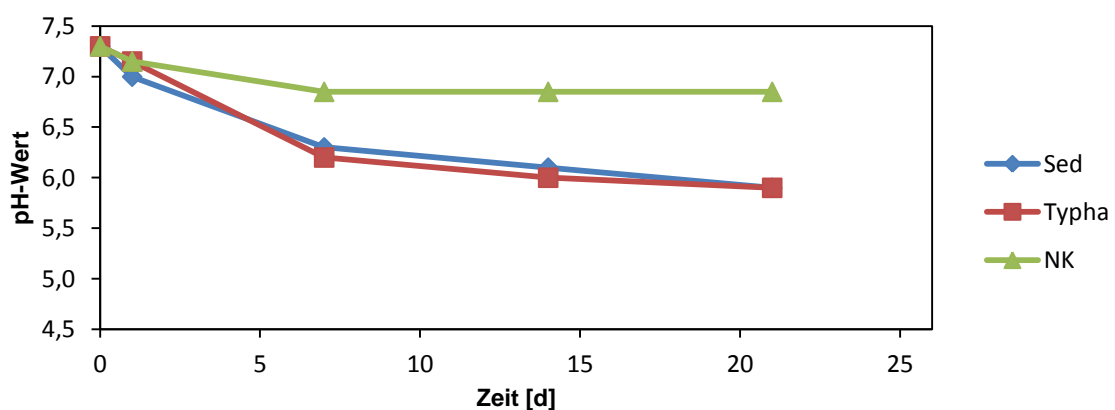
**Abbildung 8 Gaszusammensetzung des 1. Transfers der Sediment (Sed) und Typha, sowie der Negativkontrollen (NK)** Dargestellt sind die Mittelwerte der auf 100 % normierten Daten der Gaszusammensetzung zweier Parallelen der verschiedenen Anreicherungskulturen bzw. der Negativkontrollen.

Auch in diesem Versuch wiesen alle Ansätze zu Beginn der Inkubationszeit die gleiche Zusammensetzung der Gasphase von ca. 98 % N<sub>2</sub> und ca. 2 % H<sub>2</sub> auf, entsprechend der Atmosphäre in der Anaerobbox, in der die Kulturflaschen vorbereitet wurden. Bereits am Tag 1 ließ sich ein Unterschied zwischen den Sediment- bzw. Typhakulturen und den Negativkontrollen erkennen, da sich in diesen Kulturen bereits im Durchschnitt  $4,1 \pm 0$  % Kohlenstoffdioxid gebildet hatte. Alle Kulturen wiesen während der Inkubationszeit eine ähnliche Gaszusammensetzung auf. Die Kohlenstoffdioxidkonzentration nahm im weiteren Verlauf der Inkubationszeit bis Tag 15 in den Sedimentkulturen um 26 % und in den Typhakulturen um 25 % zu. Gleichzeitig stieg die Wasserstoffkonzentration in den ersten 15 Tagen in den Sedimentkulturen auf 25 % und in den Typhakulturen auf 23 % an. Mit der Bildung von Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff nahm der Stickstoffanteil in allen Kulturen ab. Die Gaszusammensetzung der Sediment- und Typhakulturen wiesen zwischen Tag 15 und Tag 21 keine großen Unterschiede auf. In keiner der Kulturen wurde Methan detektiert. Bei der Gaszusammensetzung der Negativkontrollen wurde bis Tag 15 kein Kohlenstoffdioxid detektiert, während am Tag 21  $2 \pm 1$  % Kohlenstoffdioxid gemessen wurde. Beim Vergleich der kumulativen Gasproduktion mit der Gaszusammensetzung des 1. Transfers (Abbildung 6) fällt auf,

dass die hauptsächliche Gasproduktion bis Tag 20 stattfand, obwohl sich die Gaszusammensetzung bereits ab Tag 15 nur noch geringfügig änderte.

Sowohl bei den Anreicherungskulturen als auch bei den Kulturen des 1. Transfers war die Gaszusammensetzung am Tag 1 sehr ähnlich. Im weiteren Verlauf beider Versuche (Tag 15) wird ein wesentlicher Unterschied in den Typhakulturen ersichtlich, da in der Anreicherungskultur, im Gegensatz zum 1. Transfer, Methan produziert wurde. Die Sedimentkulturen der Anreicherungskultur und des 1. Transfers wiesen während der gesamten Inkubationszeit eine ähnliche Gaszusammensetzung auf. Sowohl in der Anreicherungskultur als auch im 1. Transfer änderte sich die Gaszusammensetzung der Sediment- bzw. Typhakulturen ab Tag 15 nur noch gering. In den Anreicherungskulturen und im 1. Transfer nahm die Konzentration an Stickstoff in allen Kulturen zunächst ab (bis Tag 15) und stagnierte anschließend bis zum Ende der Inkubationszeit. Die Negativkontrollen beider Ansätze wiesen während der gesamten Inkubationszeit eine ähnliche Gaszusammensetzung auf und unterschieden sich im Wesentlichen nur dadurch, dass im 1. Transfer am Tag 21 Kohlenstoffdioxid detektiert wurde.

Aufgrund der schwachen Pufferkapazität des verwendeten Kulturmediums war es mit Hilfe der Bestimmung des pH-Werts möglich, die Säurebildung über die Inkubationszeit zu beobachten. Zu Beginn der Anreicherungskultur bzw. des 1. Transfers wurde zu dem Medium so viel Natronlauge zugegeben, dass sich ein Start-pH-Wert von 7,3 ergab. Die nachfolgende Abbildung 9 zeigt die Ergebnisse der pH-Wert Analyse der Anreicherungskultur während der gesamten Inkubationszeit.

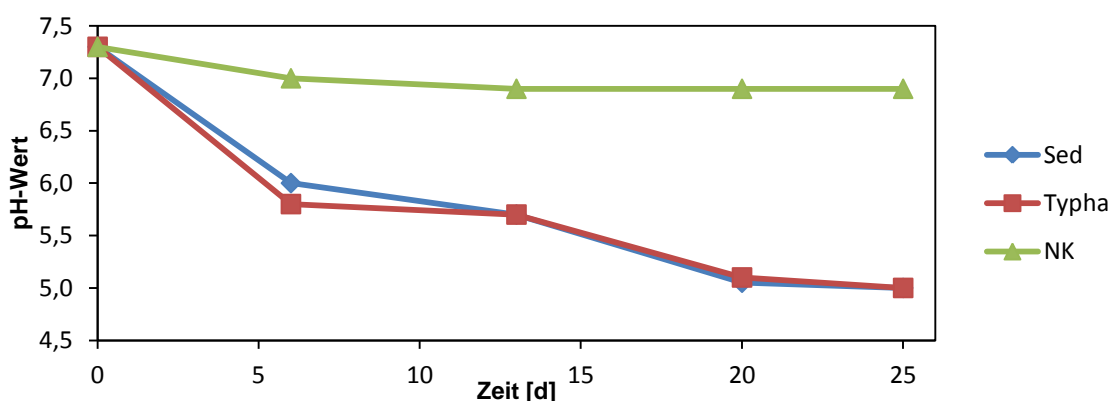


**Abbildung 9 pH-Wert der Anreicherungskulturen Sediment (Sed) und Typha, sowie der Negativkontrollen (NK)** Dargestellt sind die Mittelwerte zweier Parallelen der verschiedenen Anreicherungskulturen bzw. der Negativkontrollen. Für die Kulturen und die Negativkontrollen sind keine Balken vom Mittelwert zum Minimum bzw. Maximum dargestellt, da der pH-Wert in den Parallelen identisch war.

Der pH-Wert nahm sowohl in den Sediment- und Typhakulturen als auch in den Negativkontrollen während der Inkubationszeit ab. Der pH-Wert der Sediment- und

Typhakulturen fiel im Verlauf der folgenden 21 Tage kontinuierlich von 7,3 auf 5,9, wohingegen der pH-Wert der Negativkontrollen bis Tag 7 nur auf 6,7 fiel und sich dann bis zum Ende der Inkubationszeit keine Änderung mehr zeigte. Beim Vergleich der pH-Ergebnisse mit der kumulativen Gasproduktion wird deutlich, dass der pH-Wert der Sediment- und Typhakulturen bis Tag 14 am stärksten abnahm (im Durchschnitt  $82,9 \pm 0,7$  % der gesamten pH-Wertabnahme) und das in diesem Zeitraum ebenfalls das meiste Gas von diesen Kulturen produziert wurde.

In der nachfolgenden Abbildung 10 sind die pH-Wert Ergebnisse der Kulturen des 1. Transfers dargestellt.

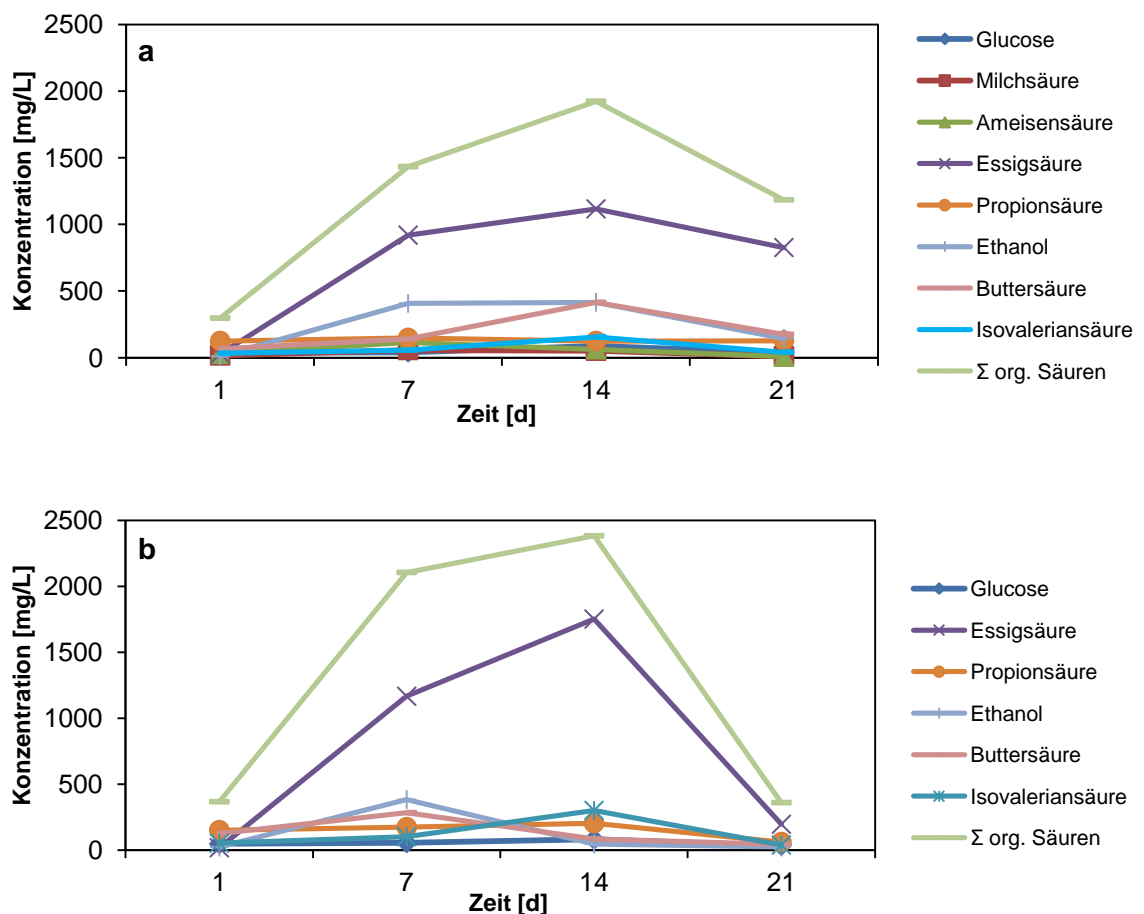


**Abbildung 10 pH-Werte des 1. Transfers der Sediment- (Sed) und Typhakulturen, sowie der Negativkontrollen (NK)** Dargestellt sind die Mittelwerte zweier Parallelen der verschiedenen Anreicherungskulturen bzw. der Negativkontrollen. Für die Kulturen und die Negativkontrollen sind keine Balken vom Mittelwert zum Minimum bzw. Maximum dargestellt da der pH-Wert in den Parallelen identisch war.

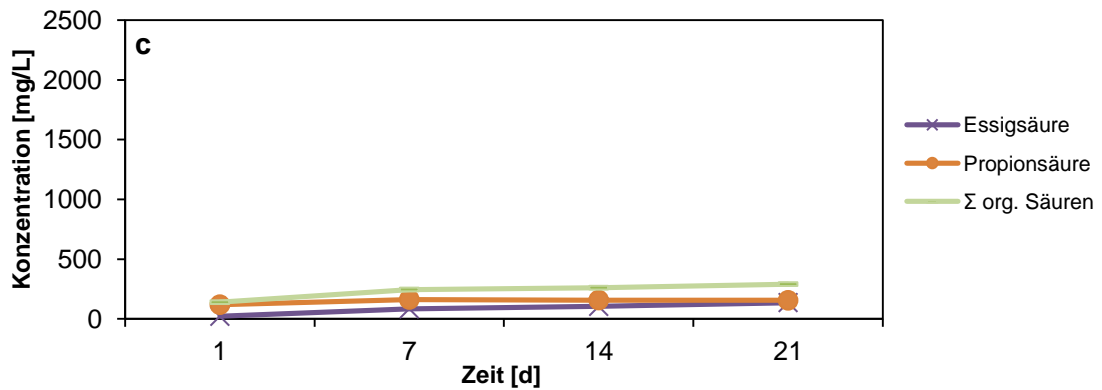
Der pH-Wert aller Kulturen und der Negativkontrolle fiel über die gesamte Inkubationszeit ab. Sowohl die Negativkontrollen als auch die Kulturen besaßen zu Beginn des Transfers einen pH-Wert von 7,3. Der pH-Wert beider Kulturen war während der gesamten Inkubationszeit sehr ähnlich. Bis Tag 6 nahm der pH-Wert in den Kulturen auf durchschnittlich  $5,9 \pm 0,1$  ab und blieb bis Tag 13 stabil. Im weiteren Verlauf der Inkubationszeit nahm der pH-Wert weiterhin ab, sodass am Ende in allen Kulturen ein pH-Wert von 5,0 vorlag. Der pH-Wert der Negativkontrollen des 1. Transfers fiel bis Tag 6 auf 7,0 und blieb bis zum Ende der Inkubationszeit gleich. Auch bei dem 1. Transfer lässt sich ein Zusammenhang zwischen der kumulativen Gasproduktion und den pH-Werten erkennen. Bis Tag 20 fiel der pH-Wert der Typhakulturen und der Sedimentkulturen auf 5,1 (im Durchschnitt  $95,7 \pm 0,0$  % der gesamten pH-Wertabnahme) stark ab. Während dieser Zeit wurde ebenfalls in beiden Kulturen am meisten Gas produziert ( $99,5 \pm 0,5$  %). In der letzten Woche der Inkubationszeit (Tag 20 bis Tag 25) fand nur noch eine geringe Gasproduktion in den Kulturen statt und auch der pH-Wert fiel nur noch von 5,1 auf 5,0 ab.

Beim Vergleich der pH-Werte der Anreicherungskulturen mit den pH-Ergebnissen des 1. Transfers fällt auf, dass bei beiden Versuchen die pH-Werte abfielen. Die pH-Werte der Sediment- und Typhakulturen der Anreicherungskultur lagen dabei im Durchschnitt bei 6,5 und damit höher als die pH-Werte des 1. Transfers (5,8). Die pH-Werte der Negativkontrollen beider Ansätze lagen im Durchschnitt bei 7,0.

Für die Analyse der Zusammensetzung der Flüssigphase der Anreicherungskulturen und des 1. Transfers wurde während der gesamten Inkubationszeit eine Analyse mittels HPLC durchgeführt. Dabei wurden Glucose, Ethanol, Milch-, Ameisen-, Essig-, Propion-, Butter-, Isobutter-, Valerian- und Isovaleriansäure gemessen, wobei nur Konzentrationen über 50 mg/L qualitativ ausgewertet werden konnten. In den nachfolgenden Abbildungen 11 a-c sind die Werte der Anreicherungskulturen (Sediment, Typha) und der Negativkontrollen dargestellt.





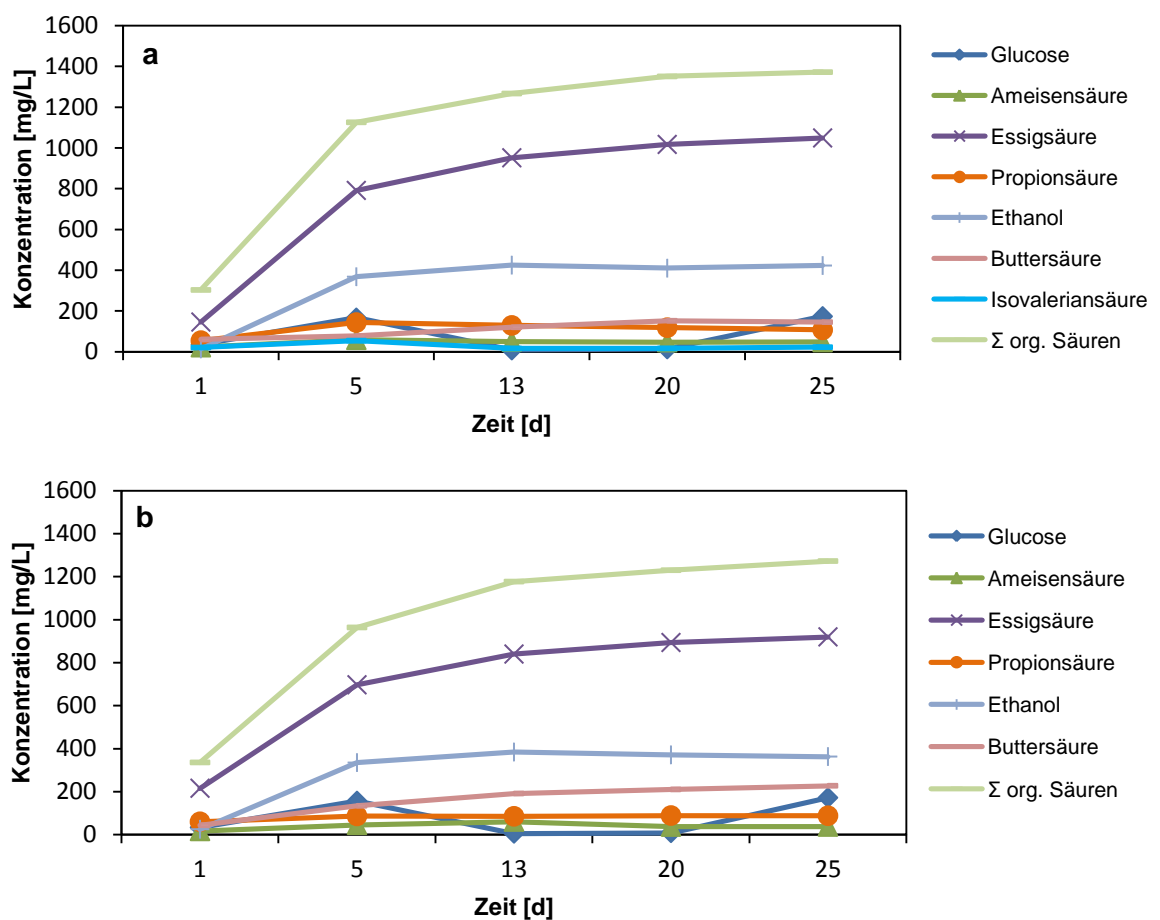


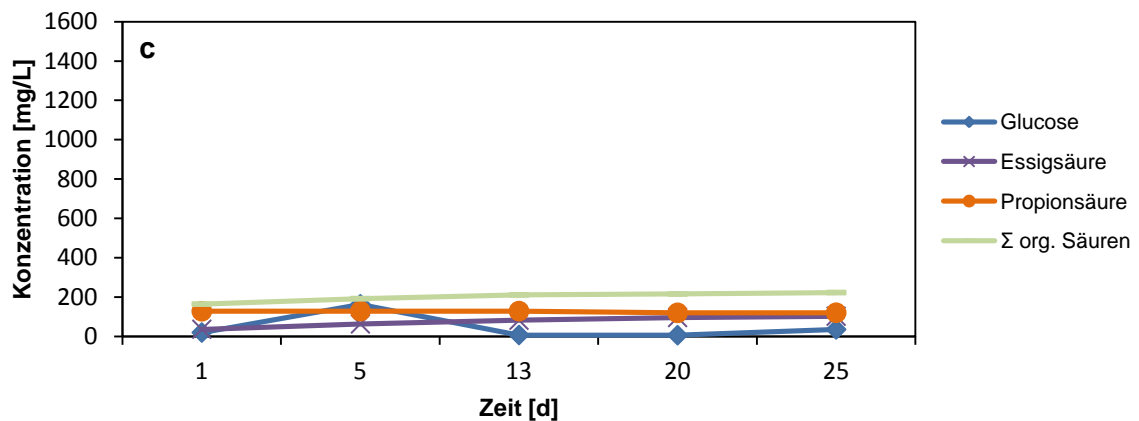
**Abbildung 11 HPLC-Ergebnisse der Anreicherungskulturen (a) Sediment und (b) Typha, sowie (c) der Negativkontrollen** Dargestellt sind die Mittelwerte von Ethanol, Glucose und den verschiedenen Säuren, welche zu jedem Zeitpunkt in zwei Parallelen einer Kultur bzw. der Negativkontrollen detektiert wurden und deren Konzentration mindestens einmal über 50 mg/L lag. Hellgrün dargestellt ist jeweils die Summe der organischen Säuren, welche in den Diagrammen dargestellt sind. Für die Kulturen und die Negativkontrollen sind keine Balken vom Mittelwert zum Minimum bzw. Maximum dargestellt, da sich die Konzentrationen der detektierten Flüssigkeiten in den Parallelen nahezu ähnlich waren.

In den Sedimentkulturen konnte zu jedem Zeitpunkt Glucose, Ethanol, Milch-, Ameisen-, Essig-, Propion-, Butter- und Isovaleriansäure detektiert werden, wobei Essigsäure mit der höchsten Konzentration auftrat. Nach 14 Tagen Inkubation wurden in den Sedimentkulturen 1115 mg/L Essigsäure gemessen. Daneben trat ebenfalls Ethanol (414 mg/L Tag 14) und Buttersäure (414 mg/L Tag 14) in höheren Konzentrationen auf. Die Konzentrationen der anderen organischen Säuren und der Glucose lagen während der gesamten Versuchszeit in den Sedimentkulturen unter 150 mg/L. In den Typhakulturen konnte zu jedem Zeitpunkt Glucose, Ethanol, Essig-, Propion-, Butter- und Isovaleriansäure detektiert werden, wobei die Essigsäure mit der höchsten Konzentration auftrat (1751 mg/L am Tag 14). Alle weiteren gelösten Metabolite traten in den Typhakulturen in Konzentrationen unter 400 mg/L auf. Am Tag 14 wurden in beiden Kulturen die höchsten Konzentrationen an Säuren (bis auf Buttersäure in den Typhakulturen), Glucose und Ethanol (bis auf Ethanol in den Typhakulturen) gemessen und anschließend nahmen die Konzentrationen bis zum Ende der Inkubationszeit ab. Die Konzentrationen der organischen Säuren nahmen in den Typhakulturen im Vergleich zu den Sedimentkulturen besonders stark ab. Die Summe der organischen Säuren lag am Ende der Inkubationszeit in den Sedimentkulturen bei  $1195 \pm 173$  mg/L und in den Typhakulturen bei  $337 \pm 76$  mg/L. In den Negativkontrollen stiegen die Konzentrationen von Essig- und Propionsäure kontinuierlich über den gesamten Versuchszeitraum an (Abbildung 11 c). Die Summe der organischen Säuren lag in den Negativkontrollen am Ende der Inkubationszeit bei  $290 \pm 0$  mg/L.

Sowohl in den Sedimentkulturen als auch in den Typhakulturen verlief die Bildung der gelösten Metabolite parallel zur Gasproduktion. Bis Tag 14 wurden die größten Konzentrationen von Säuren, Ethanol und Glucose in den Kulturen gebildet. In diesem

Zeitraum fand auch die meiste Gasproduktion in den Kulturen statt. Die Bildung von Essigsäure ging innerhalb der Anreicherungskulturen mit der Bildung von Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff einher (Abbildung 9). Beim Vergleich der HPLC-Ergebnisse mit den pH-Wert-Ergebnissen wird deutlich, dass am Tag 14 die größten Konzentrationen der organischen Säuren detektiert wurden und auch der pH-Wert bis zu diesem Zeitpunkt am stärksten abnahm. Obwohl die Konzentration der organischen Säuren, besonders in den Typhakulturen, ab Tag 14 bis zum Ende der Inkubationszeit stark abnahm, konnte kein Anstieg des pH-Wertes beobachtet werden. Für die Kulturen des 1. Transfers wurde ebenfalls die Flüssigphase mittels HPLC analysiert (Abbildungen 12 a-c).





**Abbildung 12 HPLC-Ergebnisse der Anreicherungskulturen (a) Sediment und (b) Typha, sowie (c) der Negativkontrollen** Dargestellt sind die Mittelwerte von Ethanol, Glucose und den verschiedenen Säuren, welche zu jedem Zeitpunkt in zwei Parallelen einer Kultur bzw. der Negativkontrollen detektiert wurden und deren Konzentration mindestens einmal über 50 mg/L lag. Hellgrün dargestellt ist jeweils die Summe der organischen Säuren, welche in den Diagrammen dargestellt sind. Für die Kulturen und die Negativkontrollen sind keine Balken vom Mittelwert zum Minimum bzw. Maximum dargestellt, da sich die Konzentrationen der detektierten Flüssigkeiten in den Parallelen nahezu ähnlich waren.

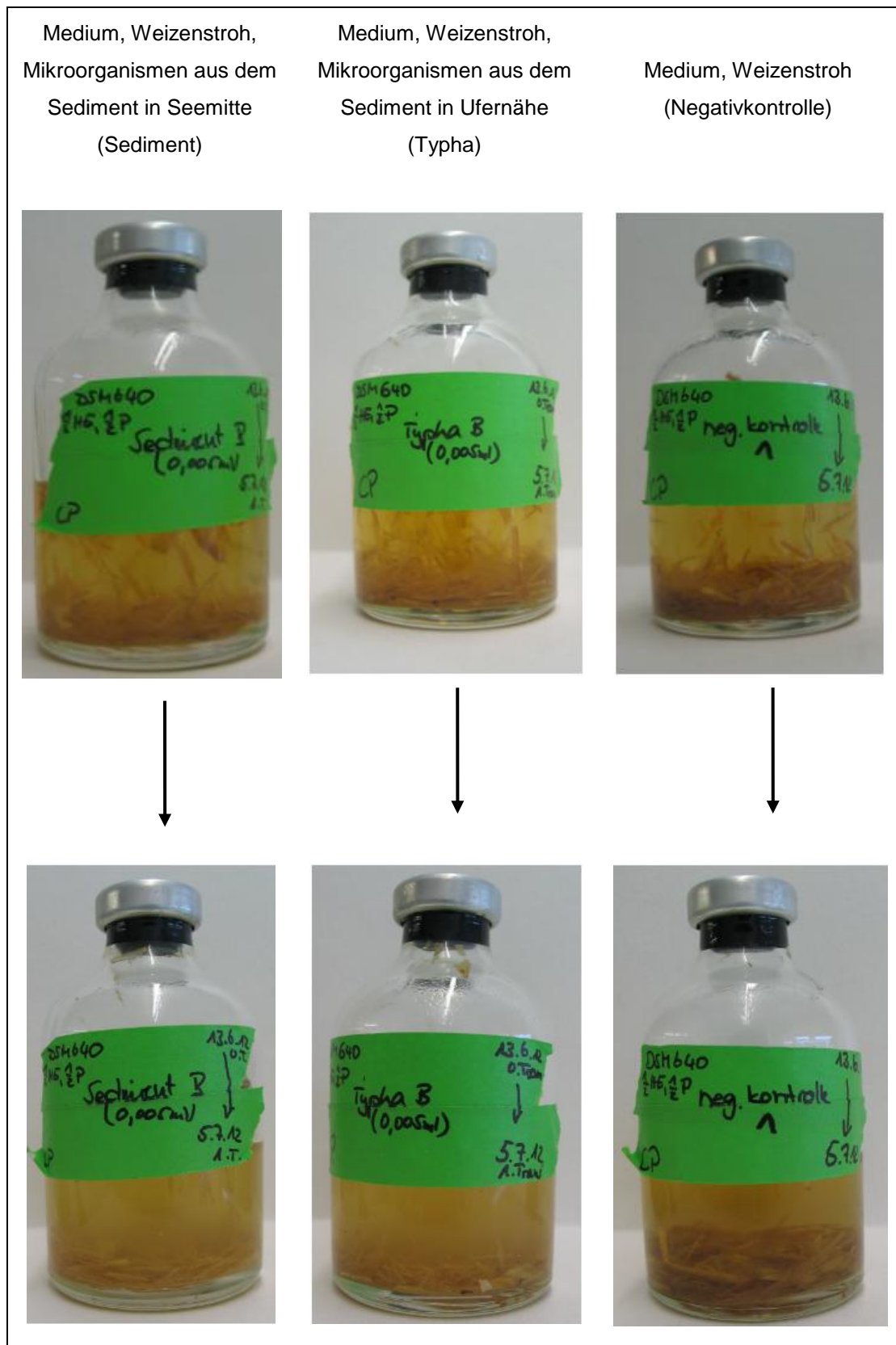
Während der gesamten Inkubationszeit des 1. Transfers wurden in den Sediment- und Typhakulturen Glucose, Ethanol, Ameisen-, Essig-, Propion-, Butter- und Isovalieransäure (letztere nur in den Sedimentkulturen) gemessen. Anders als bei der ersten Anreicherung wiesen die Kulturen einen sehr ähnlichen Verlauf bei der Bildung und dem Abbau der einzelnen Metabolite auf. Die Konzentrationen aller detektierten Säuren stiegen bis zum Ende der Inkubationszeit an, wobei Essigsäure in beiden Ansätzen am meisten gebildet wurde und am Tag 25 im Durchschnitt eine Konzentration von  $984 \pm 65$  mg/L nachgewiesen wurde. Dies entspricht durchschnittlich in den Sediment- und Typhakulturen  $73 \pm 3$  % des Gesamtsäuregehaltes. Die Konzentrationen der anderen organischen Säuren lagen in beiden Kulturen unter 200 mg/L. Am Ende der Inkubationszeit lag die Summe der organischen Säuren in den Sedimentkulturen bei  $1372 \pm 52$  mg/L und in den Typhakulturen bei  $1272 \pm 68$  mg/L. Die Konzentration von Ethanol nahm in den Sediment- und Typhakulturen bis Tag 13 kontinuierlich zu, blieb anschließend bis zum Ende der Inkubationszeit nahezu gleich und betrug am Tag 25 im Durchschnitt  $393 \pm 30$  mg/L. Die Konzentration von Glucose stieg in beiden Kulturen bis Tag 5 auf durchschnittlich  $161 \pm 5$  mg/L und fiel bis Tag 13 auf unter 50 mg/L, bevor die Konzentration erneut zwischen Tag 20 und 25 auf durchschnittlich  $173 \pm 1$  mg/L anstieg. In den Negativkontrollen des 1. Transfers nahm die Konzentration der detektierten Säuren (Essig- und Propionsäure) während der gesamten Inkubationszeit zu. Die Summe der organischen Säuren lag in den Negativkontrollen am Tag 25 bei  $223 \pm 14$  mg/L. Die Konzentration von Glucose stieg bis Tag 5 auf 163 mg/L, fiel anschließend um 156 mg/L ab und blieb bis zum Ende der Inkubationszeit unter 50 mg/L.

Sowohl in den Sedimentkulturen als auch in den Typhakulturen verlief die Bildung der gelösten Metabolite ähnlich zur Gasproduktion, da bis Tag 20 das meiste Gas produziert

wurde. Die Bildung von Essigsäure verlief innerhalb der Kulturen des 1. Transfers parallel mit der Bildung von Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff, da bis Tag 13 der Großteil der Essigsäure produziert und in diesem Zeitraum auch am meisten Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff gebildet wurde (Abbildung 9). Beim Vergleich der HPLC-Ergebnisse mit den pH-Wert-Ergebnissen wird deutlich, dass sich sowohl der pH-Wert als auch die Konzentration der organischen Säuren ab Tag 20 nur noch geringfügig veränderten.

Im Vergleich zu den Anreicherungskulturen war die Konzentration der organischen Säuren in den Kulturen des 1. Transfers am Ende der Inkubationszeit bis zu 935 mg/L größer. Außerdem nahm die Konzentrationen der Säuren, des Ethanol und der Glucose in den Anreicherungskulturen spätestens ab Tag 14 ab, wohingegen im 1. Transfer ein stetiger Anstieg bzw. ab Tag 13 eine gleichbleibende Konzentration der Säuren bzw. des Ethanol und eine Ab- und wieder Zunahme der Glucosekonzentration beobachtet wurde. In allen Anreicherungskulturen und in allen Kulturen des 1. Transfers wurden Glucose, Ethanol, Essig-, Propion-, Buttersäure detektiert. Ameisen-, Milch und Isovaleriansäure wurden nicht in allen Kulturen gemessen. In allen Kulturen war die Konzentration der Essigsäure über die gesamte Inkubationszeit im Vergleich zu den anderen Metaboliten am höchsten. Die Negativkontrollen beider Ansätze wiesen in Bezug auf die Summe der organischen Säuren am Ende der Inkubationszeit im Durchschnitt  $257 \pm 33$  mg/L auf. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den Negativkontrollen der Anreicherungskultur und des 1. Transfers war, dass in den Negativkontrollen des 1. Transfers Glucose detektiert wurde, deren Konzentration stark schwankte und eine Konzentration von bis zu 156 mg/L erreichte.

Für die Beurteilung des Strohabbaus und des Wachstums der Mikroorganismen der Anreicherungskulturen und des 1. Transfers wurden wöchentlich das Aussehen der Kulturen dokumentiert und Fotografien erstellt. Nachfolgend ist exemplarisch die visuelle Analyse der Kulturen des 1. Transfers innerhalb eines Inkubationszeitraums von drei Wochen dargestellt (Abbildung 13).



**Abbildung 13 Visuelle Analyse der Kulturen und der Negativkontrolle des 1. Transfers** Oben sind die Kulturen bzw. Negativkontrolle des 1. Transfers zu Beginn der Inkubation (6.7.12) dargestellt und unten die gleichen Flaschen nach 3 Wochen Inkubationszeit.

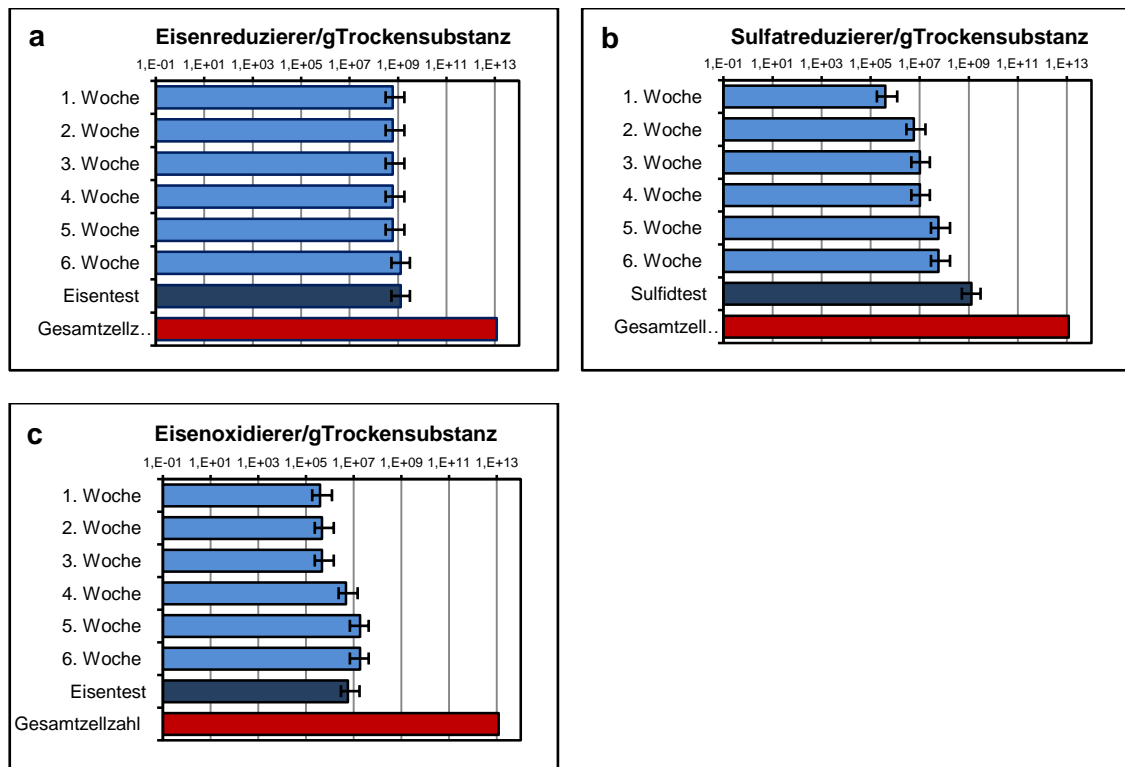
Die Kulturen mit Stroh und Mikroorganismen waren zu Beginn der Inkubationszeit identisch mit der Negativkontrolle. Bereits in der ersten Woche zeigten die beimpften Flaschen allerdings eine stärkere Trübung im Vergleich zu den Negativkontrollen, welche bis zum Ende der Inkubationszeit zunahm. Die Negativkontrollen wiesen während des Versuchsverlaufs keine Trübung auf. Die Farbe des Mediums in den Kulturen mit Stroh und Mikroorganismen änderte sich von einem hellen Gelb-Orange in ein dunkleres Orange, wobei die Negativkontrollen stets gleich blieben (helles Gelb-Orange). Das Stroh, welches zu Beginn in allen Flaschen teilweise an der Oberfläche schwamm, war nach drei Wochen Inkubationszeit auf den Boden der Flaschen gesunken. In den beimpften Flaschen wurden während der Inkubationszeit zunehmend Risse im Stroh und auch kleinere Strohstücke beobachtet. Das Aussehen des Strohs der Negativkontrolle blieb über den gesamten Versuchszeitraum unverändert.

Im Vergleich zum 1. Transfer war das Medium der Anreicherungskultur durch die Zugabe der Sedimentproben von Beginn an trüb bzw. dunkel, sodass keine Änderungen hinsichtlich der Farbe und Trübung während der Inkubationszeit beobachtet werden konnten (Anlage 9). Die Negativkontrollen der Anreicherungskulturen hatten die gleiche Farbe des Mediums und des Strohs, wie die des 1. Transfers und änderten sich während der gesamten Inkubationszeit nicht.

## **4.2 Abschätzung der Zellzahl verschiedener Mikroorganismengruppen in Biogasreaktoren mittels der MPN-Methode**

Für die Abschätzung der Zellzahl von Eisenoxidierern, sowie Eisen- und Sulfatreduzierern in drei verschiedenen Biogasreaktoren wurden mit Hilfe von selektiven Wachstumsmedien verschiedenen Verdünnungsreihen der Reaktorabläufe in 96-Deep Well Platten angesetzt und diese für sechs Wochen inkubiert. Im Folgenden werden die Ergebnisse der optischen Beobachtungen während der gesamten Inkubationszeit und die durchgeführten photometrischen Sulfid- und Eisentests in der sechsten Woche vorgestellt. Des Weiteren werden die Ergebnisse der einzelnen photometrischen Tests für die drei Reaktorproben gezeigt.

Nachfolgend sind exemplarisch für die optischen Beobachtungen, sowie für die Eisentests ( $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}_{\text{tot}}$ ) und den Sulfidtest die MPN-Ergebnisse des Reaktors 4.1 (Schlempereaktor) dargestellt (Abbildung 14 a-c). Die Diagramme für den Reaktor 3.1 (Hühnertrockenkotreaktor) und den Reaktor 4.12 (Schlempe- und Strohareaktor) sind der Anlage 10 zu entnehmen.



**Abbildung 14 Most Probable Number des Reaktors 4.1 (Schlempereaktor)** für (a) Eisenreduzierer, (b) Sulfatreduzierer und (c) Eisenoxidierer; Dargestellt sind die Ergebnisse der optischen Beobachtungen während der Inkubationszeit (hellblau), die Ergebnisse des jeweiligen photometrischen Tests ( $\text{Fe}^{2+}$ -,  $\text{Fe}_{\text{tot}}$ - und Sulfidtest) (dunkelblau) und die Gesamtzellzahl des Reaktors (rot) in Zellen/gTrockensubstanz. Die Fehlerbalken geben das 95 % Konfidenzintervall an.

Die Ergebnisse der Eisenreduzierer (Abbildung 14 a) zeigten von Beginn der Inkubationszeit eine hohe Zellzahl von  $6,0 \cdot 10^8$  Zellen/gTrockensubstanz (Zellen/gTS), welche auch in den darauf folgenden fünf Wochen kaum zunahm. Die Durchführung des Eisentests für  $\text{Fe}^{2+}$  in Woche 6 ergab eine höhere Zellzahl von  $1,3 \cdot 10^9$  Eisenreduzierer/gTS und bezogen auf die Gesamtzellzahl von  $1,19 \cdot 10^{13}$  Zellen/gTS ergab dies 0,01 % Eisenreduzierer im Reaktor 4.1 (Schlempereaktor). Während der gesamten Inkubationszeit ließen sich ein kontinuierlicher Anstieg der Sulfatreduzierer (Abbildung 14 b) von  $3,9 \cdot 10^5$  Zellen/gTS in der ersten Woche auf  $5,7 \cdot 10^7$  Sulfatreduzierer/gTS in der sechsten Woche erkennen. Der Sulfidtest in Woche 6 ergab eine Zellzahl von  $5,4 \cdot 10^9$  Sulfatreduzierern/gTS, was bezogen auf die Gesamtzellzahl des Reaktors 4.1 0,05 % darstellt. Während die Zellzahl der Eisenoxidierer (Abbildung 14 c) in den ersten drei Wochen bei durchschnittlich  $4,3 \cdot 10^5$  Eisenoxidierer/gTS lag, stieg die Zellzahl in den letzten drei Wochen bis auf  $1,9 \cdot 10^7$  Eisenoxidierer/gTS in der sechsten Woche an. Die errechneten  $\text{Fe}^{3+}$ -Werte aus den Eisentests für  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Fe}_{\text{tot}}$  ergaben eine Abnahme der Zellzahl auf  $5,7 \cdot 10^6$  Eisenoxidierer/gTS. Der Reaktor 4.1 enthielt sowohl nach den Ergebnissen der Beobachtungen in Woche 6 als auch nach den Ergebnissen des Eisentests jeweils <0,01 % Eisenoxidierer. Beim Vergleich der Zellzahlen der Mikroorganismengruppen (Woche 6, basierend auf den photometrischen Tests)

untereinander fällt auf, dass sowohl die Eisenreduzierer als auch die Sulfatreduzierer eine viel höhere Zellzahl (im Durchschnitt  $3,4 \cdot 10^9$  Zellen/gTS höher) aufwiesen, als die Eisenoxidierer, wobei die Zellzahl der Sulfatreduzierer am höchsten war.

In der nachfolgenden Tabelle 2 sind die Ergebnisse der optischen Beobachtungen und der einzelnen photometrischen Tests in Woche 6 für alle drei Reaktoren und für alle Mikroorganismengruppen dargestellt.

**Tabelle 2 Überblick über die MPN-Ergebnisse und die Gesamtzellzahl aller drei Reaktoren: Reaktor 3.1 (Hühnertrockenkotreaktor), Reaktor 4.12 (Stroh- und Schlempereaktor) und Reaktor 4.1 (Schlempereaktor)** Neben der Gesamtzellzahl sind die visuell und die durch die photometrischen Tests für  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}_{\text{tot}}$ - und Sulfidkonzentration ermittelten Zellzahlen in Woche 6 für Eisen- und Sulfatreduzierer sowie für Eisenoxidierer in Zellen/gTS für diese Reaktoren gezeigt. In Klammern ist jeweils das obere und untere Konfidenzintervall von 95 % angegeben. Die Ergebnisse für Eisen- und Sulfatreduzierer sowie für Eisenoxidierer wurden mit Hilfe des MPN-Programms [Klee, 1993] errechnet und nach Salama et al. [1978] korrigiert.

	Reaktor 3.1	Reaktor 4.12	Reaktor 4.1
<b>Gesamtzellzahl</b> [Zellen/gTS]	$1,14 \cdot 10^{13}$	$1,17 \cdot 10^{13}$	$1,19 \cdot 10^{13}$
<b>Eisenreduzierer</b> [Zellen/gTS]			
Visuell	$2,2 \cdot 10^5$ ( $8,0 \cdot 10^4$ - $5,1 \cdot 10^5$ )	$1,3 \cdot 10^7$ ( $5,4 \cdot 10^6$ - $3,1 \cdot 10^7$ )	$1,3 \cdot 10^9$ ( $5,4 \cdot 10^8$ - $3,1 \cdot 10^9$ )
Eisentest für $\text{Fe}^{2+}$ und $\text{Fe}_{\text{tot}}$	$8,1 \cdot 10^6$ ( $4,9 \cdot 10^6$ - $2,3 \cdot 10^7$ )	$2,0 \cdot 10^7$ ( $7,4 \cdot 10^6$ - $4,6 \cdot 10^7$ )	$1,3 \cdot 10^9$ ( $5,4 \cdot 10^8$ - $3,1 \cdot 10^9$ )
<b>Sulfatreduzierer</b> [Zellen/gTS]			
Visuell	$3,8 \cdot 10^4$ ( $1,8 \cdot 10^4$ - $1,2 \cdot 10^5$ )	$8,3 \cdot 10^6$ ( $4,1 \cdot 10^6$ - $2,4 \cdot 10^7$ )	$5,7 \cdot 10^7$ ( $3,0 \cdot 10^7$ - $1,8 \cdot 10^8$ )
Sulfidtest	$2,9 \cdot 10^5$ ( $1,1 \cdot 10^5$ - $7,4 \cdot 10^5$ )	$8,3 \cdot 10^6$ ( $4,1 \cdot 10^6$ - $2,4 \cdot 10^7$ )	$5,4 \cdot 10^9$ ( $5,4 \cdot 10^8$ - $3,1 \cdot 10^9$ )
<b>Eisenoxidierer</b> [Zellen/gTS]			
Visuell	$3,8 \cdot 10^4$ ( $1,8 \cdot 10^4$ - $1,2 \cdot 10^5$ )	$3,9 \cdot 10^5$ ( $1,9 \cdot 10^5$ - $1,2 \cdot 10^6$ )	$1,9 \cdot 10^7$ ( $7,0 \cdot 10^6$ - $4,3 \cdot 10^7$ )
Eisentest für $\text{Fe}^{2+}$ und $\text{Fe}_{\text{tot}}$	$1,9 \cdot 10^6$ ( $7,2 \cdot 10^5$ - $4,4 \cdot 10^6$ )	$3,9 \cdot 10^5$ ( $1,9 \cdot 10^5$ - $1,2 \cdot 10^6$ )	$5,7 \cdot 10^6$ ( $3,0 \cdot 10^6$ - $1,8 \cdot 10^7$ )

Die Gesamtzellzahlen der drei Reaktorabläufe lagen in dem Bereich von  $1,14 \cdot 10^{13}$  bis  $1,19 \cdot 10^{13}$  Zellen/gTS, wobei der Hühnertrockenkotreaktor (Reaktor 3.1) die niedrigste und der Schlempereaktor (Reaktor 4.1) die höchste Gesamtzellzahl aufwies. Da alle Reaktoren eine ähnliche Gesamtzellzahl aufwiesen, ließen sich die MPNs der drei untersuchten Mikroorganismengruppen zwischen den Reaktoren gut vergleichen.



Durch die chemischen Analysen in Woche 6 wurden stets erhöhte oder gleiche Zellzahlen für alle drei Mikroorganismengruppen in allen drei Reaktorabläufen (Ausnahme Reaktor 4.1 für Eisenoxidierer) ermittelt als durch die optischen Beobachtungen.

Im Reaktor 3.1 ergaben sich mit Hilfe des Eisentests für  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $8,1 \cdot 10^6$  Eisenreduzierer/gTS, was zahlenmäßig die größte untersuchte Mikroorganismengruppe in diesem Reaktor darstellte. In Bezug auf die Gesamtzellzahl enthielt der Hühnertrockenkotreaktor (Reaktor 3.1)  $<0,01$  % Eisenreduzierer. Die Zellzahl der Sulfatreduzierer, welche mit Hilfe des Sulfidtests bestimmt wurde, lag bei  $2,9 \cdot 10^5$  Sulfatreduzierer/gTS und war in diesem Reaktor die kleinste im Vergleich zu Eisenreduzierern und -oxidierern. Durch die Eisentests ( $\text{Fe}_{\text{tot}}$  und  $\text{Fe}^{2+}$ ) wurde eine Zellzahl von  $1,9 \cdot 10^6$  Zellen/gTS für die Eisenoxidierer ermittelt. Somit lag diese Mikroorganismengruppe zahlenmäßig zwischen den Eisen- und Sulfatreduzierern.

Im Reaktor 4.12 (Stroh und Schlempe) wurden mittels des Eisentests für  $\text{Fe}^{2+}$   $2,0 \cdot 10^7$  Zellen/gTS Eisenreduzierer bestimmt. Diese waren somit die am häufigsten vorkommenden Mikroorganismen im Vergleich zu den Eisenoxidierern und Sulfatreduzierern im Reaktor 4.12. In Bezug auf die Gesamtzellzahl ergaben sich in diesem Reaktor  $<0,01$  % Eisenreduzierer. Durch den Sulfidtest wurde eine Zellzahl von  $8,3 \cdot 10^6$  Sulfatreduzierer/gTS ermittelt. Die Zellzahl der Sulfatreduzierer war im Vergleich zu den Eisenoxidierern, bei denen eine Zellzahl von  $3,9 \cdot 10^5$  Zellen/gTS bestimmt wurde, um  $7,9 \cdot 10^6$  Zellen/gTS höher.

In den Reaktoren 3.1 und 4.12 waren die Eisenreduzierer die am häufigsten vorkommenden Mikroorganismen der untersuchten Mikroorganismengruppen. Im Reaktor 4.1 (Schlempe) traten die Sulfatreduzierer am häufigsten auf, während diese Mikroorganismengruppe im Hühnertrockenkotreaktor (Reaktor 3.1) die am wenigsten vertretene Gruppe darstellte. In Reaktor 4.12 (Stroh und Schlempe) und Reaktor 4.1 (Schlempe) traten die Eisenoxidierer mit der geringsten Zellzahl der untersuchten Mikroorganismen auf.

Beim Vergleich der Ergebnisse aller drei Reaktoren untereinander, fällt auf, dass im Reaktor 4.1 die Zellzahl sowohl von Eisenoxidierern als auch von Eisen- und Sulfatreduzierern durch visuelle Bestimmung und durch die photometrischen Tests in Woche 6 am höchsten war. Im Mittel lagen die Zellzahlen aller drei Mikroorganismengruppen des Reaktors 4.12, basierend auf den visuellen und analytischen Ergebnissen, und am wenigstens der untersuchten Mikroorganismengruppen konnten im Reaktor 3.1 detektiert werden.

**Tabelle 3 Ergebnisse der photometrischen Tests ( $\text{Fe}^{2+}$ -,  $\text{Fe}_{\text{tot}}$ - und Sulfidtest) und des Nitrattests der drei Reaktorabläufe: Reaktor 3.1 (Hühnertrockenkotreaktor), Reaktor 4.12 (Stroh- und Schlempereaktor) und Reaktor 4.1 (Schlempereaktor)** Die photometrischen Tests und der Nitrattest der Reaktorabläufe wurden direkt nach der Probenahme aus dem jeweiligen Reaktor durchgeführt.

	Reaktor 3.1	Reaktor 4.12	Reaktor 4.1
<b>Eisentest <math>\text{Fe}^{2+}</math> [mmol/gTS]</b>	0,001	0,044	0,042
<b>Eisentest <math>\text{Fe}_{\text{tot}}</math> [mmol/g TS]</b>	0,003	0,053	0,070
<b>Sulfidtest <math>\text{S}^{2-}</math> [mmol/g TS]</b>	0,580	0,811	2,400
<b>Nitrattest [mg/L]</b>	0	0	0

Für die drei Reaktorabläufe wurden ebenfalls direkt nach der Probenahme der Eisentest (Bestimmung von  $\text{Fe}^{2+}$  und  $\text{Fe}_{\text{tot}}$ ) und der Sulfidtest (Bestimmung von  $\text{S}^{2-}$ ) durchgeführt. Der Eisentest ergab nach 24 h Extraktion mit 0,5 M HCl für den Reaktorablauf des Reaktors 4.12 (Stroh- und Schlempereaktor) die höchste  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration bezogen auf die Trockensubstanz und der Hühnertrockenkotreaktor enthielt die niedrigste  $\text{Fe}^{2+}$ -Konzentration bezogen auf die Trockensubstanz. Der Schlempereaktor wies die höchste Konzentration an  $\text{Fe}_{\text{tot}}$  auf und der Hühnertrockenkotreaktor besaß die niedrigste Konzentration an  $\text{Fe}_{\text{tot}}$ . Durch die Subtraktion der  $\text{Fe}_{\text{tot}}$ -Werte mit den  $\text{Fe}^{2+}$ -Werten ergaben sich die Werte für  $\text{Fe}^{3+}$  aller drei Reaktorabläufe. Der Schlempereaktor (Reaktor 4.1) enthielt demnach 0,028 mmol/gTS  $\text{Fe}^{3+}$ , der Reaktor 4.12 0,009 mmol/gTS  $\text{Fe}^{3+}$  und der Hühnertrockenkotreaktor mit 0,002  $\text{Fe}^{3+}$  mmol/gTS  $\text{Fe}^{3+}$  die niedrigste Konzentration an  $\text{Fe}^{3+}$ . Der Sulfidtest der drei Reaktorabläufe ergab, dass im Schlempereaktor die Sulfidkonzentration am höchsten war (2,400 mmol/gTS). Im Reaktor 4.12 lag die Sulfidkonzentration bei 0,811 mmol/gTS und im Hühnertrockenkotreaktor lag die Sulfidkonzentration am niedrigsten der drei Reaktorabläufe (0,580 mmol/gTS). Zusätzlich wurde für alle drei Reaktorabläufe ein Nitrattest durchgeführt, welcher für alle drei Reaktorabläufe ergab, dass kein Nitrat vorhanden war.

## 5 Diskussion

Eine Aufgabe der vorliegenden Arbeit waren die Anreicherung und ein 1. Transfer von lignocellulolytischen Mikroorganismen. Im Ergebnisteil wurde gezeigt, welche Abbauprodukte von Weizenstroh durch lignocelluloseverwertende Anreicherungskulturen aus Sedimenten eines Thermalsees entstanden. In der folgenden Diskussion werden die Ergebnisse mit Daten aus der Literatur verglichen und diskutiert. Im zweiten Teil werden die Ergebnisse für die Abschätzung der Zellzahlen von Eisenoxidierern, sowie Eisen- und Sulfatreduzierern in drei verschiedenen Laborreaktoren mit Daten aus der Literatur und mit den Ergebnissen der MPN-Platten der Praxisarbeit „Abschätzung von Nitrat-, Eisen- und Sulfatreduzierern in Biogasreaktoren mittels der Most Probable Number (MPN)“ [Poch, 2012] verglichen.

### 5.1 Anreicherung lignocellulolytischer Mikroorganismen aus dem Seesediment eines Thermalsees

#### 5.1.1 Sediment- und Typhakulturen

Für die Anreicherung der anaeroben, lignocelluloseverwertenden Mikroorganismen wurden aus zwei Seesedimentproben des Thermalsees Héviz zwei Anreicherungskulturen angesetzt und ein 1. Transfer dieser Kulturen durchgeführt. Bei den Proben handelte es sich einerseits um eine Sedimentprobe aus der Bodenregion in Seemitte (Sediment A und B) und andererseits um eine Sedimentprobe aus der Umgebung in Ufernähe (Typha A und B). Die Ergebnisse der Anreicherungskulturen und des 1. Transfers werden im Folgenden in Bezug auf den Biogasprozess und den Strohabbau diskutiert. Sowohl bei den Anreicherungskulturen als auch bei den Kulturen des 1. Transfers handelte es sich um Batchsysteme, bei denen die einzelnen Prozessstufen der Biogasgewinnung zeitlich versetzt, wenn auch mit Überschneidungen, abliefen.

Grundsätzlich war festzustellen, dass sich das Aussehen der Kulturen im Verlauf der Inkubationszeit veränderte. Zu Beginn war das Medium in allen Kulturen sehr klar und wurde mit der Zeit stets trüber. Dies lässt auf ein Wachstum der Mikroorganismen schließen. Auch die einzelnen Strohstücke wurden über den Verlauf der Inkubationszeit kleiner und bekamen Risse, was auf den mikrobiellen Abbau des Substrates hindeutet.

Sowohl in der Anreicherungskultur als auch im 1. Transfer fand eine Gasproduktion in den einzelnen Kulturen statt, wobei diese über die Zeit kontinuierlich abnahm. In den Anreicherungskulturen fand die hauptsächliche Gasproduktion ( $92,7 \pm 5,7$  % der

Gesamtgasproduktion) bis Tag 14 und in den Kulturen des 1. Transfers ( $99,5 \pm 0,5$  % der Gesamtgasproduktion) bis Tag 20 statt. Diese unterschiedlichen Zeitpunkte des Beginns der Stagnationsphase könnten darauf zurückgeführt werden, dass die Anreicherungskulturen womöglich mit mehr als  $10^6$  Zellen/mL inokuliert wurden, da 2-3 g Sedimentproben des Thermalsees hinzugegeben wurden, ohne dass die Zellzahl bestimmt wurde. Somit enthielten die Anreicherungskulturen wahrscheinlich mehr Mikroorganismen als die Kulturen des 1. Transfers, wodurch die stagnierende kumulative Gasproduktion eher einsetzte. Das Stagnieren der kumulativen Gasproduktion in allen Kulturen könnte mehrere Gründe haben. Durch den Abbau des Weizenstrohs könnten toxischen Abbaustoffe entstanden sein, welche die Mikroorganismen hemmten. Dies könnten beispielsweise schädliche Produkte sein, die während der Acidogenese entstanden (z.B. Essigsäure) [Han et al., 1978]. Zudem könnte das verbliebene Weizenstroh nicht mehr bioverfügbar und die vorhandenen Nährstoffe aufgebraucht gewesen sein. Durch den Substratabbau erfolgte außerdem die Bildung von Säuren, welche sich in einem Abfall des pH-Wertes zeigte (Abbildung 7 und 8). Diese Übersäuerung und der damit verbundene Abfall des pH-Wertes führten wahrscheinlich dazu, dass das Wachstum der Mikroorganismen gehemmt wurde. Sowohl die Ergebnisse der optischen Beobachtungen als auch die Ergebnisse der Gasproduktion lassen auf einen mikrobiellen Abbau des Strohs schließen. Dies wurde ebenfalls durch die weiteren angewandten analytischen Methoden bestätigt.

Mit Hilfe der durchgeführten HPLC-Messungen wurden Substanzen detektiert, welche während der anaeroben Vergärung von Biomasse gebildet werden. In der ersten Stufe des Biogasprozesses, der Hydrolyse, werden komplexe Verbindungen durch hydrolytische Bakterien in Oligomere und Monomere gespalten [Weiland, 2010]. Hierbei entsteht beispielsweise durch die Hydrolyse von Cellulose Glucose, welche ebenfalls in allen Kulturen der Anreicherungskultur und des 1. Transfers detektiert wurde. In den Anreicherungskulturen wurde stets nur eine geringe Glucosekonzentration quantifiziert, da diese nach der Freisetzung wahrscheinlich schnell umgesetzt wurde. Die Messung der Glucosekonzentration deutet auf eine dauerhafte Hydrolyse des Strohs hin, da Glucose sowohl in den Anreicherungskulturen (Abbildung 11a und 11b) als auch in den Kulturen des 1. Transfers (Abbildung 12a und 12b) während der gesamten Inkubationszeit nachweisbar war. Dies zeigt, dass das Stroh auch am Ende des Versuchs noch bioverfügbar war und somit nicht der Grund für eine beobachtete Abnahme der Gasproduktion sein kann. Während in den Anreicherungskulturen eine konstante Glucosekonzentration detektiert wurde, wurde in den Kulturen des 1. Transfers zunächst eine Zunahme, anschließend eine Abnahme und zuletzt wieder eine Zunahme der

Glucosekonzentration beobachtet. Die Abnahme der Glucose-konzentration lässt sich damit erklären, dass die Glucose während dieser Zeit entweder sehr schnell umgesetzt wurde oder die Hydrolyse des Strohs nur geringfügig stattfand. Die Produkte der Acidogenese des Biogasprozesses sind vor allem Alkohole und organische Säuren, wie Propion- und Buttersäure, doch auch Essigsäure kann in dieser Phase des Biogasprozesses bereits entstehen [Nielsen et al., 2007; Demirel und Scherer, 2008]. Diese Substanzen wurden in den Anreicherungskulturen sowie in den Kulturen des 1. Transfers während der gesamten Inkubationszeit detektiert, wobei vor allem Essigsäure und Ethanol in größeren Konzentrationen gemessen wurden. Diese typischen Gärungsprodukte wurden ebenfalls in weiteren Experimenten mittels HPLC quantifiziert, wie beispielsweise während der Fermentation von Kohlenhydraten in einem Biogasreaktor [Ren et al., 1996]. Zusätzlich wurden in der vorliegenden Arbeit weitere organische Säuren, wie beispielsweise Propionsäure, Ameisensäure (Ausnahme Typhakultur in der Anreicherung) und Isovaleriansäure (Ausnahme Typhakultur im 1. Transfer) in geringen Konzentrationen gemessen. Das könnte darauf zurückgeführt werden, dass einerseits organische Säuren, wie z.B. Ameisensäure, sehr schnell gebildet, jedoch ebenfalls schnell verbraucht wurden oder dass andererseits einige Gärungsarten dominierten, während andere, wie beispielweise die Bildung der Ameisensäure, nur eine untergeordnete Rolle spielten [Boone et al. 1993].

Während der Acetogenese entsteht neben Wasserstoff und Kohlenstoffdioxid auch Essigsäure, welche während der gesamten Inkubationszeit in allen Anreicherungskulturen und in den Kulturen des 1. Transfers am häufigsten auftrat. Diese organische Säure wurde bereits in ähnlichen Versuchen als Hauptfermentationsprodukt von Kohlenhydraten erfasst [Ren et al., 1996; Schnürer et al., 1996]. Bei den Typhakulturen der Anreicherungskultur nahm die Konzentration der Essigsäure ab Tag 14 sehr viel stärker ab, als bei den Sedimentkulturen (Abbildung 11 a und b). Dies ist wahrscheinlich auf das Vorhandensein der Methanogenese in den Typhakulturen zurückzuführen, welche sich direkt an die Acetogenese anschließt.

Allgemein ließ sich während der gesamten Inkubationszeit der Anreicherungskulturen zunächst eine Zunahme und anschließend eine Abnahme der organischen Säuren, des Ethanols und der Glucose erkennen. Dies ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, dass in den Anreicherungskulturen die einzelnen Phasen des Biogasprozesses zeitlich versetzt abliefen. Des Weiteren könnten durch das Inokulieren des Medium Sedimentproben aus dem Thermalsee Héviz Elektronenakzeptoren und Mikroorganismen, die diese nutzen können, eingetragen worden sein, sodass metabolische Prozesse in diesen Kulturen stattfanden, welche beispielsweise gebildete organische Säuren synthetisierten bzw. als Elektronendonoren nutzten. Dies würde erklären, warum auch in der Sedimentkultur die

Essigsäurekonzentration am Ende des Versuchs abnahm, obwohl keine Methanogenese in diesen Kulturen stattfand. In den Sediment- und Typhakulturen des 1. Transfers stiegen die Konzentrationen an Ethanol, Glucose und organischen Säuren während der gesamten Inkubationszeit kontinuierlich an, was darauf zurückzuführen ist, dass der Biogasprozess in diesen Kulturen nur bis zur Acidogenese stattfand. Zudem enthielt das Medium des 1. Transfers, im Gegensatz zu den Anreicherungskulturen, keine zusätzlich eingebrachten Elektronendonoren. Somit konnte in den Kulturen des 1. Transfers keine anaerobe Atmung, wie eventuell in den Anreicherungskulturen, stattfinden.

Der pH-Wert in den Anreicherungskulturen fiel von 7,3 auf 5,9 (Abbildung 9) und in den Kulturen des 1. Transfers (Abbildung 10) von 7,3 auf 5,0 bis jeweils zu dem Zeitpunkt, an dem auch die Gasproduktion stagnierte (Tag 14 bzw. Tag 20). Ähnliches wurde in Experimenten mit dem thermophilen, anaeroben Bakterium *Clostridium thermosuccinogenes* festgestellt [Drent et al., 1990]. Drent et al. zeigten, dass die maximale Aktivität des Bakteriums bei einem pH-Wert von 6,8 und einer Temperatur von 58 °C lag. Ab einem pH-Wert kleiner 6,0 wies das Bakterium kein Wachstum mehr auf. Laut Van der Zant und Camp [2006] gilt die pH-Wert-Abnahme als Indikator für die Substrathydrolyse und die Acidogenese. Dies wurde ebenfalls in einem Versuch festgestellt, in dem die biologische Vorbehandlung von Stroh mit Mikroorganismen untersucht wurde [Zhong et al., 2011]. Hierbei fiel der pH-Wert beständig ab, während die Säureproduktion (Hydrolyse und Acidogenese) zunahm. In den Anreicherungskulturen des vorliegenden Versuchs fiel der pH-Wert von 7,3 nur auf 5,9, wobei der pH-Wert der Kulturen des 1. Transfers von 7,3 auf 5,0 fiel. Dieser Unterschied in der pH-Wert-Abnahme lässt sich damit erklären, dass die Anreicherungskulturen durch die zugegebenen Seeproben wahrscheinlich einen natürlichen Puffer enthielten und somit eventuell weitere metabolische Prozesse außer Hydrolyse und Gärung in diesen Kulturen stattfanden. Beim Vergleich der Bildung von organischen Säuren mit der pH-Wert-Abnahme der Anreicherungskulturen und des 1. Transfers wurde keine Korrelation festgestellt, was darauf hindeutet, dass entweder Säuren produziert wurden, die nicht mit der HPLC erfasst wurden oder dass freie Protonen entstanden.

Mit Hilfe der Analyse der Gaszusammensetzung wurden in allen Kulturen Gase detektiert, welche während des Biogasprozesses entstehen (Kohlenstoffdioxid, Wasserstoff und Methan) (Abbildung 7 und 8). Während der gesamten Versuchszeit wurde zudem Stickstoff in allen Kulturen quantifiziert. Dieses Gas wurde durch die Vorbereitung der Kulturflaschen in der sauerstofffreien Atmosphäre (98 % Stickstoff, 2 % Wasserstoff) in der Anaerobox in die Kulturflaschen eingetragen. Die Anteile der Gase, welche während

dem Biogasprozess entstanden, vergrößerten sich während der gesamten Inkubationszeit, wobei sich der Anteil an Stickstoff verringerte, da dieser aus den Kulturflaschen verdrängt wurde.

Während der Hydrolyse, Acidogenese und Acetogenese des Biogasprozesses werden vor allem Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff gebildet [Weiland, 2010]. Diese typischen Hydrolysegase wurden sowohl in den Anreicherungskulturen als auch in den Kulturen des 1. Transfers detektiert, wobei die Anteile dieser Gase von Tag 1 bis Tag 15 zunahmen. Anschließend blieb die Gaszusammensetzung aller Kulturen bis zum Ende der Inkubationszeit gleich. Diese unveränderte Gaszusammensetzung muss jedoch nicht bedeuten, dass Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff nicht verbraucht wurden. Beide Gase könnten stets durch Gärung erneut produziert worden sein, da diese Gase in jeder Stufe der anaeroben Vergärung entstehen und sich die verschiedenen Prozessstufen in den Batch-Kulturen teilweise überlagerten [Nielsen et al., 2007; Weiland, 2010].

In einer der beiden Typhakulturen der Anreicherungskulturen wurde mittels GC-Analyse ab Tag 15 Methan detektiert. Methan kann während der Methanogenese über zwei verschiedene Wege synthetisiert werden [Ferry, 2011]. Einerseits entsteht Methan durch hydrogenotrophe methanogene Archaeen, welche Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff nutzen, andererseits kann die Methanbildung durch die acetoclastischen methanogenen Archaeen erfolgen, welche direkt aus Essigsäure Methan und Kohlenstoffdioxid synthetisieren [Zeikus et al., 1975; Thauer et al., 1977]. Die Reaktionswege der hydrogenotrophen und acetoclastischen methanogenen Archaeen sind in der nachfolgenden Tabelle 4 dargestellt.

**Tabelle 4 Reaktionen der hydrogenotrophen und acetoklastischen methanogenen Archaeen**

<b>Methanogene Archaeen</b>	<b>Reaktionsweg</b>
hydrogenotroph	$\text{CO}_2 + 4 \text{H}_2 \rightarrow \text{CH}_4 + 2 \text{H}_2\text{O}$
acetoclastisch	$\text{CH}_3\text{COOH} \rightarrow \text{CH}_4 + \text{CO}_2$

Die GC-Ergebnisse lassen vermuten, dass die Typhakultur wahrscheinlich hydrogenotrophe methanogene Archaeen enthielt, da der Gehalt an Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff geringfügig abnahm, während der Methangehalt anstieg. Jedoch könnten auch die acetoclastischen methanogenen Archaeen Methan produziert haben, da der Anteil an Kohlenstoffdioxid nur gering abnahm und somit eventuell verbrauchter Kohlenstoffdioxid durch erneut produzierten Kohlenstoffdioxid durch die acetoclastischen methanogenen Archaeen ersetzt wurde (Abbildung 9). Diese Vermutung wird teilweise auch durch die Ergebnisse der HPLC unterstützt, da der Anteil an Essigsäure ab Tag 14 bis zum Versuchsende sehr stark abnahm (Abbildung 11b). In diesem Kontext könnten

jedoch auch weitere Bakterien, wie beispielsweise die homoacetogenen Bakterien, welche Essigsäure zu Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff oxidieren, eine Rolle spielen, wodurch die Essigsäurekonzentration ebenfalls sinken kann [Hattori, 2008]. Des Weiteren entsteht durch hydrogenotrophe methanogene Archaeen ein Unterdruck und durch acetoclastische methanogene Archaeen ein Überdruck (Tabelle 4). Aus der Abbildung 5 lässt sich erkennen, dass in den Typhakulturen ab Tag 14 nur geringe Mengen an Gas produziert wurden, was die Vermutung festigt, dass das Methan durch die hydrogenotrophen Methanogenen Archaeen entstand. Aufgrund der Ergebnisse lässt sich jedoch nicht eindeutig feststellen, auf welchem Weg das Methan produziert wurde, sodass sowohl hydrogenotrophe als auch acetoclastische methanogene Archaeen für die Methanbildung verantwortlich gewesen sein könnten. In dem darauffolgenden 1. Transfer der Typhakultur wurde kein Methan quantifiziert. Vermutlich wurden nur wenige Methanogene von der Anreicherungskultur in die Kulturen des 1. Transfers überimpft. Zudem könnte der niedrige pH-Wert am Ende der Anreicherungskultur und im 1. Transfer ein Grund für das Verschwinden der Methanogenen im 1. Transfer sein, da diese eher einen neutralen bzw. alkalischen pH-Wert-Bereich bevorzugen [Schattner und Gronauer, 2001]. Zudem sind die meisten Methanbildner, aufgrund des niedrigen Energiegewinns aus den zur Methanbildung möglichen Stoffwechselwegen, langsam wachsenden Methanbildnern [Thauer et al., 2008], sodass die kurze Kultivierungszeit von 21 bzw. 25 Tagen für das Verschwinden der methanogenen Archaeen verantwortlich sein könnte. Beispielsweise weist *Methanosarcina barkeri*, welches zu den methanogenen Archaeen zählt, eine Verdopplungszeit von 13 h auf, wohingegen ein *Clostridium sporosphaeroides* (ebenfalls den methanogenen Archaeen zugehörig) eine Verdopplungszeit von nur 2 h aufweist [Reuter et al., 2010].

Anhand der vorliegenden Ergebnisse wird von einem vollständigen Biogasprozess in einer der beiden Typhakulturen der Anreicherungskultur ausgegangen, während in allen anderen Kulturen der Abbau des Stroh während der Acetogenese aufhörte. Weiterhin zeigten die Ergebnisse, dass die Ziele, eine Anreicherung von lignocelluloseverwertenden Mikroorganismen aus dem Seesediment des Thermalsees Héviz und ein 1. Transfer dieser Mikroorganismen in frisches Medium, erfolgreich erreicht wurden.

### 5.1.2 Negativkontrollen

Im weiteren Verlauf werden die einzelnen Analyseergebnisse der Negativkontrollen betrachtet, da in vorangegangenen Versuchen Probleme mit der Sterilisation des Stroh auftraten. Aufgrund dessen wurden verschiedene Vorversuche zur Sterilisation von Stroh durchgeführt. Diese Vorversuche zeigten, dass durch die Zugabe von anoxischem



Leitungswasser und einer Inkubation von 24 h bei 55 °C die Sporen aus dem Stroh in vegetative Zellen umgewandelt wurden, welche das anschließende Autoklavieren nicht überlebten.

In allen Negativkontrollen der Anreicherung und des 1. Transfers wurde bis Tag 1 eine geringe Gasproduktion beobachtet, welche auf die Erwärmung des Mediums bzw. des Strohs durch das Ansetzen der Kulturen bei Raumtemperatur und der anschließenden Inkubation bei 55 °C und der dadurch entstandenen Gasmenge, zurückgeführt werden kann. Im weiteren Verlauf der Inkubationszeit wurde in den Kontrollen kaum bzw. keine Gasproduktion beobachtet, was darauf schließen lässt, dass hier kein Strohabbau stattfand. Dies wird ebenfalls durch die Ergebnisse der pH-Wert-Messungen unterstützt. Der pH-Wert der Kontrollen nahm sowohl in den Anreicherungskulturen als auch in den Kulturen des 1. Transfers bis Tag 6 geringfügig von 7,3 auf 6,9 ab und blieb anschließend bis zum Ende der Inkubationszeit konstant. Die Analyse der Gaszusammensetzung ergab über die gesamte Inkubationszeit in den Negativkontrollen der Anreicherungskulturen eine gleichbleibende Zusammensetzung (98 % N<sub>2</sub> und 2 % H<sub>2</sub>), welche der Atmosphäre der Anaerobbox entsprach, in denen die Kulturflaschen vorbereitet wurden. In den Negativkontrollen des 1. Transfers wurde eine geringe Menge an Kohlenstoffdioxid gebildet. Dies lässt darauf schließen, dass in diesen Kontrollen ein Ab- bzw. Umbau, beispielsweise von Hefeextrakt oder Pepton aus dem Medium oder ein Abbau des Strohs, stattfand und somit Kohlenstoffdioxid entstand. Die Ergebnisse der HPLC-Analyse ergaben, dass sowohl in den Negativkontrollen der Anreicherungskultur als auch in denen des 1. Transfers geringe Mengen an Essig- und Propionsäure gebildet wurden. Diese organischen Säuren könnten durch die Synthese von Nährstoffen des Mediums oder durch den Abbau des Strohs entstanden sein. In den Negativkontrollen des 1. Transfers wurde zusätzlich Glucose detektiert, was darauf hindeutet, dass in diesen Kontrollen eine beginnende Hydrolyse des Strohs stattfand. Das erklärt auch die detektierte Kohlenstoffdioxidkonzentration in diesen Kontrollen. In allen Negativkontrollen wurde optisch kein Wachstum von Mikroorganismen beobachtet, da sich das Aussehen der Kontrollen während der gesamten Inkubationszeit nicht veränderte. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse lässt sich feststellen, dass der Sterilisationsprozess für die Negativkontrollen der Anreicherungskultur erfolgreich durchgeführt wurde, da diese während der gesamten Inkubationszeit negativ waren. Im Falle der Kontrollen des 1. Transfers kann anhand der vorliegenden Ergebnisse von einer geringen mikrobiellen Aktivität ausgegangen werden, die aber deutlich unter der Aktivität der Ansätze mit Mikroorganismen lag.

## 5.2 Abschätzung der Zellzahl verschiedener Mikroorganismengruppen in Biogasreaktoren mittels der MPN-Methode

### 5.2.1 Untersuchte Mikroorganismengruppen in den drei Biogasreaktoren

Die Ergebnisse aller MPN-Platten werden im Folgenden diskutiert und mit Literaturdaten verglichen. Dabei werden stets die Ergebnisse der photometrischen Tests für  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Fe}_{\text{tot}}$  und Sulfid betrachtet, da diese chemischen Analysen meist mehr Zellzahlen als die optischen Auswertungen ergaben. Dies lag daran, dass die chemischen Analysen sensitiver waren als die optische Auswertung. Die photometrischen Analysen sollten daher unbedingt am Ende der Inkubationszeit durchgeführt werden, um die maximale Zellzahl zu erhalten.

Bei den drei untersuchten Reaktoren handelt es sich um den Reaktor 4.1, welcher mit Schlempe und FerroSorp<sup>®</sup> gefahren wurde, um den Reaktor 4.12, welcher mit Stroh und Schlempe gefüttert wurde und um den Reaktor 3.1, welcher ausschließlich mit Hühnertrockenkot gefahren wurde. Im Hühnertrockenkotreaktor wurden am wenigstens und im reinen Schlempereaktor am meisten der untersuchten Mikroorganismen detektiert. Der Reaktor mit dem Substrat Stroh und Schlempe lag zahlenmäßig zwischen Hühnertrockenkot- und Schlempereaktor. Diese Verteilung lässt sich jeweils auf die eingesetzten Substrate zurückführen.

Im Hühnertrockenkotreaktor (Reaktor 3.1) wurden am wenigsten Eisenoxidierer, sowie Eisen- und Sulfatreduzierer ermittelt, da sich in Hühnertrockenkot ein hoher Anteil an Stickstoff, aber nur geringe Mengen an Eisen für einen potentiellen Eisenkreislauf und nur eine geringe Menge an Sulfat für die Sulfatreduzierer befindet [Bujoczek et al., 2000]. Trotzdem wurden geringe Mengen an Eisenoxidierern detektiert, da diese neben Eisen(III) auch Wasserstoff als Elektronendonator und zusätzlich Acetat bzw. Nitrat als Elektronenakzeptoren nutzen können. Zudem können die Eisenoxidierer bei einem geringen Gehalt an Eisen Gärung betreiben. Auch die Eisenreduzierer können die Gärung, zusätzlich zur anaeroben Atmung, für die Energiegewinnung nutzen [Lovley, 1997 und Weber et al., 2006]. Des Weiteren können die Eisenreduzierer, z.B. das Bakterium *Geobacter metallireducens*, Acetat als Elektronendonator und Wasserstoff als Elektronenakzeptor nutzen, wodurch sich das Auftreten im Reaktor 3.1 erklären lässt [Hedrich et al., 2011]. Die geringe Menge der detektierten Sulfatreduzierer lässt sich ebenfalls damit erklären, dass diese, wenn nicht ausreichend Schwefelverbindungen, wie beispielsweise Sulfat oder Thiosulfat, vorhanden sind, zum fermentativen Stoffwechsel wechseln können [Madigan und Martinko, 2006]. So können einige in der Anwesenheit von Lactat und Pyruvat wachsen und produzieren Acetat [Widdel und Hansen, 1992].

Im reinen Schlempereaktor (Reaktor 4.1) wurden die am meisten der untersuchten Mikroorganismen ermittelt. Sulfat wird in diesem Reaktor durch die proteinreiche und somit schwefelhaltige Schlempe in den Biogasreaktor eingetragen, welches den Sulfatreduzierern als Elektronenakzeptor zur Verfügung steht [Henkelmann et al., 2012]. Da in diesem Reaktor aufgrund der Aktivität der Sulfatreduzierer Sulfid entsteht, wird FerroSorp® eingesetzt, um das toxische und korrosive Sulfid zu binden. Dabei handelt es sich um eine unbekannte Zusammensetzung einer Eisenmineralmischung, welche wiederum von den Eisenoxidierern und -reduzierern genutzt werden kann. Diese Mikroorganismengruppen stellen sich gegenseitig das Eisen(II) bzw. das Eisen(III) zur Verfügung, sodass in diesem Reaktor ein potentieller Eisenkreislauf stattfinden könnte. Sowohl verschiedenen Bakterien, wie *Shewanella putrefaciens* und *Geobacter metallireducens* als auch Archaeen können die Eisenreduktion vornehmen [Straub et al., 2001; Lovley, 2006], während die Eisenoxidation meistens an die Nitrat- aber auch an die Schwefelreduktion gebunden ist [Hedrich et al., 2011]. *Dechloromonas aromatica* zählt zu den wenigen, der bisher identifizierten Eisenoxidierern, welche gleichzeitig Nitrat reduzieren können [Hedrich et al., 2011].

Der Stroh- und Schlempereaktor 4.12 lag in Bezug auf die Anzahl der untersuchten Mikroorganismen im Mittel zwischen Hühnertrockenkotreaktor und Schlempereaktor. Da dieser Biogasreaktor ohne FerroSorp® gefahren wurde, lässt sich so die geringere Menge an Eisenoxidierern sowie -reduzierern im Vergleich zum reinen Schlempereaktor erklären. Da die Anzahl dieser Mikroorganismen jedoch höher lag als im Hühnertrockenkotreaktor, welcher ebenso ohne FerroSorp® gefahren wurde, lag daran, dass der Stroh- und Schlempereaktor zu Beginn mit dem Reaktorablauf eines Schlempereaktors mit FerroSorp® angefahren wurde. Einerseits sind somit in diesem Reaktor noch Eisenoxidierer und -reduzierer vorhanden, da dieser Reaktor eine hohe Verweilzeit des Substrates besitzt und die Mikroorganismen nur sehr langsam ausgespült werden. Andererseits könnte zusätzlich noch eine geringe Menge Eisen im Reaktor vorhanden sein. Zudem können beispielsweise die Eisenreduzierer weitere Elektronendonoren wie Wasserstoff und Elektronenakzeptoren wie Acetat nutzen oder Gärung betreiben [Straub et al., 2001]. Sulfat wurde im Stroh- und Schlempereaktor durch das proteinreiche Substrat Schlempe eingebracht. Da dieser Reaktor jedoch nicht ausschließlich mit Schlempe gefüttert wurde, sondern ebenfalls mit Stroh, war die Sulfatkonzentration und somit die Anzahl der Sulfatreduzierer nicht so hoch wie im reinen Schlempereaktor.

### 5.2.2 $\text{Fe}_{\text{tot}}$ -, $\text{Fe}^{2+}$ -, Nitrat- und Sulfidgehalt der Reaktoren

In allen drei Reaktorabläufen wurden direkt nach der Probenahme der  $\text{Fe}_{\text{tot}}$ -,  $\text{Fe}^{2+}$ -, und Sulfidtest sowie der Nitrattest durchgeführt. Der Schlempereaktor (Reaktor 4.1) wies den höchsten  $\text{Fe}_{\text{tot}}$ -Gehalt (0,275 mmol/gTS) und der Hühnertrockenkotreaktor den geringste  $\text{Fe}_{\text{tot}}$ -Gehalt (0,001 mmol/gTS) auf. Der Stroh- und Schlempereaktor wies einen  $\text{Fe}_{\text{tot}}$ -Gehalt von 0,053 mmol/gTS auf, welcher niedriger als der  $\text{Fe}_{\text{tot}}$ -Gehalt des reinen Schlempereaktors und höher als der des Hühnertrockenkotreaktors. Man kann davon ausgehen, dass sich der hohe  $\text{Fe}_{\text{tot}}$ -Gehalt im Schlempereaktor auf das eingesetzte FerroSorp<sup>®</sup> zurückführen lässt, da hauptsächlich auf diesem Wege Eisenminerale in einen Biogasreaktor gelangen. Da der Schlempereaktor als einziger der untersuchten Reaktoren zum Zeitpunkt der Probenahme mit FerroSorp<sup>®</sup> gefahren wurde, lässt sich so der hohe Eisengesamtgehalt gegenüber dem Stroh- und Schlempereaktor, welcher nur zu Beginn mit einem Reaktorablauf aus einem Schlempereaktor mit FerroSorp<sup>®</sup> angefahren wurde, und gegenüber dem Hühnertrockenkotreaktor erklären. Im Hühnertrockenkotreaktor wurde zwar ebenso ein  $\text{Fe}_{\text{tot}}$ -Gehalt nachgewiesen, da Eisen ein Spurenelement ist und dieses durch das Substrat eingetragen wurde, jedoch war diese Konzentration vernachlässigbar gering. Zusätzlich wurde in allen drei Reaktorproben  $\text{Fe}^{2+}$  nachgewiesen, wobei die Konzentration im Hühnertrockenkotreaktor vernachlässigbar gering war (0,003 mM/gTS).

Die Ergebnisse der  $\text{Fe}_{\text{tot}}$ - und  $\text{Fe}^{2+}$ -Tests deuten darauf hin, dass hauptsächlich im Schlempereaktor (Reaktor 4.1) sowie im Stroh- und Schlempereaktor (Reaktor 4.12) ein potentieller Eisenkreislauf stattfinden könnte. Da im Reaktor 4.12 und Reaktor 4.1 durchschnittlich  $72 \pm 11 \%$   $\text{Fe}^{2+}$  vom Gesamteisengehalt vorlagen, wird davon ausgegangen, dass in diesen Reaktoren hauptsächlich die Eisenreduktion und nur geringfügig die Eisenoxidation stattfindet. Im Hühnertrockenkotreaktor findet, aufgrund der niedrigen  $\text{Fe}_{\text{tot}}$ - und  $\text{Fe}^{2+}$ -Gehalte, nur geringfügig ein Eisenkreislauf, wahrscheinlich hauptsächlich mit weiteren Elektronenakzeptoren bzw. -donoren, statt. Für den Eisenkreislauf in allen Reaktoren nutzen die Eisenreduzierer wahrscheinlich endogen und exogen produzierte lösliche externe Elektronenshuttles, wie Huminstoffe für den Elektronentransport [Straub et al., 2001], da die Eisen(III)oxide, die als Elektronenakzeptoren dienen, schwer löslich sind im Vergleich zu anderen gelösten Elektronenakzeptoren, wie zum Beispiel Nitrat oder Sulfat. Ein Vorteil dieser Elektronenshuttles ist, dass die Mikroorganismen ihre Elektronen nicht direkt auf die schwer löslichen Elektronenakzeptoren übertragen müssen, da dies durch die Elektronenshuttles geschieht [Weber et al., 2006; Lovley, 1997]. Zudem können Eisenreduzierer Fettsäuren und aromatische Verbindungen zu Kohlenstoffdioxid oxidieren und gleichzeitig Eisen(III)oxide reduzieren [Lovley, 1997]. Da die Eisenreduzierer und die

Sulfatreduzierer die gleichen Elektronendonoren benutzen, konkurrieren diese Mikroorganismengruppen miteinander in Bezug auf die Elektronendonoren [Lovley, 2006], wobei die Eisenreduzierer durch die Zugabe des FerroSorps® begünstigt werden. Die Produkte der Eisenreduktion sind lösliches  $\text{Fe}^{2+}$  und, je nach Vorhandensein anderer Ionen, verschiedene Eisen(II)- oder Eisen(II)-Eisen(III)-Minerale [Weber et al., 2006]. Diese Reaktionsprodukte können durch Eisenoxidierer erneut zu  $\text{Fe}^{3+}$  oxidiert werden, welches aufgrund seiner geringen Löslichkeit als Eisen(III)oxid ausfällt. Die Eisenoxidation läuft unter anaeroben Bedingungen meist durch eine Kopplung mit der Nitratreduktion ab [Straub et al, 1996]. Diese eisenoxidierenden und nitratreduzierenden Mikroorganismen nutzen das bereits reduzierte Eisen als Elektronendonator und das Nitrat als Elektronenakzeptor. Des Weiteren werden diese Mikroorganismen in autotrophe und heterotrophe (benötigen organische Stoffe) Mikroorganismen unterteilt [Hedrich et al, 2011]. Die entstehenden Hauptprodukte sind hierbei Eisen(III)oxide und Stickstoff sowie eventuell Distickstoffmonoxid [Straub et al. 2001; Benz et al 1998]. Da jedoch der Nitrattest ergab, dass kein Nitrat in den drei Reaktorproben vorhanden war, ist es ungewiss, ob die Eisenoxidation gekoppelt an die Nitratreduktion in den untersuchten überhaupt Reaktoren stattfinden kann. In anderen Versuchen wurde beobachtet, dass die Eisenoxidation auch mit molekularem Sauerstoff als Elektronenakzeptor oder in Verbindung mit der Schwefelreduktion bei saurem pH-Wert, durch das Bakterium *Acidithiobacillus ferrooxidans*, stattfinden kann [Hedrich et al., 2011]. Des Weiteren kann die Eisenoxidation durch phototrophe Eisenoxidierer stattfinden [Straub et al. 2001], was allerdings in den einzelnen Reaktoren keine Rolle spielt, da diese lichtundurchlässig waren. Inwieweit die Eisenoxidation in diesen Reaktoren gekoppelt an die Nitratreduktion stattfinden kann, müsste in weiteren Versuchen untersucht werden, da die verwendeten Nitratteststäbchen für die Reaktorproben eventuell nicht sensitiv genug waren. Fest steht jedoch, dass sowohl Eisenreduzierer als auch Eisenoxidierer in den untersuchten Reaktoren vorhanden waren und somit ein potentieller Eisenkreislauf vor allem im Schlempereaktor und im Stroh- und Schlempereaktor möglich ist.

In allen drei Reaktoren wurde Sulfid nachgewiesen, wobei im Schlempereaktor 4.1 die höchste und im Hühnertrockenkotreaktor 3.1 die niedrigste Konzentration vorlag. Auch diese Ergebnisse sind auf das eingesetzte Substrat zurückzuführen, da dem Reaktor 4.1 hauptsächlich proteinreiche Schlempe, dem Reaktor 4.12 weniger Schlempe und zusätzlich Stroh und dem Reaktor 3.1 nur Hühnertrockenkot zugeführt wurde. Je höher die eingesetzte Menge an Schlempe, umso höher die Konzentration an Sulfat und umso mehr Sulfatreduzierer konnten detektiert werden, welche Sulfat in Sulfid reduzieren. Stams et al. (2005) führten Versuche durch, um die Konkurrenz zwischen Sulfatreduzierern und Methanbildern näher zu untersuchen. Dabei wurde

herausgefunden, dass eine direkte Konkurrenz zwischen den Sulfatreduzierern und den Methanbildnern in Bezug auf Wasserstoff und Acetat besteht und dass sulfatreduzierende Mikroorganismen viel beweglicher als die Methanbilder sind. Wenn Sulfat in einem Reaktor vorhanden ist, konkurrieren zusätzlich homoacetogene Bakterien mit den Methanbildnern und sulfatreduzierenden Mikroorganismen um Wasserstoff, wobei aus thermodynamischen Gründen die Sulfatreduktion begünstigt wird [Stams et al., 2005].

In den untersuchten Reaktoren kann, im Gegensatz zum Eisenkreislauf, kein Schwefelkreislauf stattfinden, da das entstehende Sulfid nur unter aeroben Bedingungen zu Sulfat zurückoxidiert werden kann [Stams et al., 2005]. Da kein Sauerstoff in den Reaktoren vorlag, kann demzufolge keine Sulfurikation und somit kein vollständiger Schwefelkreislauf stattfinden.

### 5.2.3 Vergleich mit weiteren MPN-Studien

Im Folgenden werden die vorliegenden Ergebnisse zunächst mit den Ergebnissen der Praxisarbeit „Abschätzung von Nitrat-, Eisen- und Sulfatreduzierern in Biogasreaktoren mittels der Most Probable Number (MPN)“ [Poch, 2012] und anschließend mit weiteren MPN-Studien verglichen und diskutiert.

Die Probenahmen für die Reaktorabläufe der Reaktoren 4.1 und 3.1 fanden für die Praxisarbeit Anfang März 2012 statt, während für die Bachelorarbeit drei Reaktoren, Reaktor 4.1, Reaktor 3.1 und zusätzlich Reaktor 4.12 Anfang Juni 2012 beprobt wurden. Mit Hilfe der MPN-Methode in Kombination mit dem Eisentest wurden in der Praxisarbeit  $2,7 \cdot 10^5$  Eisenreduzierer/gTS und in der vorliegenden Arbeit  $1,3 \cdot 10^9$  Eisenreduzierer/gTS für den Schlemperreaktor (Reaktor 4.1) nachgewiesen. Beide Zellzahlen weichen um vier Größenordnungen voneinander ab, wobei die erneute Bestimmung eine sehr viel höhere Zellzahl ergab. Für den Reaktor 3.1 (Hühnertrockenkotreaktor) wurde ebenfalls eine starke Abweichung der Zellzahlen beobachtet, wobei in der Praxisarbeit eine höhere Zellzahl von  $1,10^9$  Eisenreduzierer/gTS als in der vorliegenden Arbeit ( $8,1 \cdot 10^6$  Eisenreduzierer/gTS) ermittelt wurde. Diese starken Abweichungen können einerseits auf eventuelle Probleme innerhalb der beiden Reaktoren während der drei Monate, welche zwischen den Probenahmen lagen, zurückzuführen sein oder mit der Erhöhung der Probenvolumina für den Eisentest zusammenhängen, wodurch der Eisentest in der Bachelorarbeit genauer war.

Der Sulfidtest ergab in der Praxisarbeit für den Reaktor 4.1 (Schlemperreaktor) eine ähnlich hohe Anzahl Sulfatreduzierer wie in der vorliegenden Arbeit (in der Praxisarbeit:  $1,3 \cdot 10^9$  Sulfatreduzierer/gTS; in der Bachelorarbeit:  $5,4 \cdot 10^9$  Sulfatreduzierer/gTS). Im Reaktor 3.1 wurde in der Praxisarbeit eine Zellzahl von  $1,2 \cdot 10^7$  Sulfatreduzierer/gTS und

in der vorliegenden Arbeit  $2,9 \cdot 10^5$  Sulfatreduzierer/gTS ermittelt. Die Abweichungen in Bezug auf die Zellzahl der Sulfatreduzierer werden auf den Sulfidtest zurückgeführt, da auch hier für die Bachelorarbeit das Probenvolumen erhöht wurde und der Sulfidtest somit sensibler war.

Beim Vergleich der Ergebnisse der Praxisarbeit für die  $\text{Fe}_{\text{tot}}$ - und  $\text{Fe}^{2+}$ -Tests der Reaktorproben mit den Ergebnissen der Bachelorarbeit fällt auf, dass alle Ergebnisse der Praxisarbeit höher lagen als in der Bachelorarbeit. Im Ablauf des Hühnertrockenkotreaktors wurde während der Praxisarbeit  $0,392 \text{ mmol/gTS Fe}^{2+}$  und  $0,442 \text{ mmol/gTS Fe}_{\text{tot}}$  bestimmt, wohingegen während der Bachelorarbeit  $0,001 \text{ mmol/gTS Fe}^{2+}$  und  $0,003 \text{ mmol/gTS Fe}_{\text{tot}}$  bestimmt wurden. Ebenso wurde für den Schlempereaktor während der Praxisarbeit eine höhere Konzentration an  $\text{Fe}^{2+}$  ( $1,35 \text{ mmol/gTS}$ ) und  $\text{Fe}_{\text{tot}}$  ( $1,42 \text{ mmol/gTS}$ ) bestimmt, als durch die Versuche in der Bachelorarbeit detektiert wurden ( $0,28 \text{ mmol/gTS Fe}^{2+}$  und  $0,07 \text{ mmol/gTS Fe}_{\text{tot}}$ ). Der Sulfidtest ergab für die Praxisarbeit sehr viel geringere Werte als in der Bachelorarbeit bestimmt wurden, wobei die Ergebnisse des Hühnertrockenkotreaktors geringere Abweichungen zeigten als die Ergebnisse des Schlempereaktors. Für den Hühnertrockenkotreaktor wurden  $0,33 \text{ mmol/gTS Sulfid}$  und für den Schlempereaktor  $0,37 \text{ mmol/gTS Sulfid}$  während der Praxisarbeit detektiert. Durch die Versuche während der Bachelorarbeit wurden im Hühnertrockenkotreaktor  $0,58 \text{ mmol/gTS Sulfid}$  und im Schlempereaktor  $2,40 \text{ mmol/gTS Sulfid}$  bestimmt. Diese unterschiedlichen Ergebnisse der Eisentests und des Sulfidtests lassen sich vermutlich auf den Zeitraum, der zwischen den Probenahmen lag, und die damit verbundene Änderungen innerhalb der Reaktoren zurückführen.

Straub und Buchholz-Cleven [1998] führten ebenfalls Versuche zur Abschätzung der Zellzahl von Eisenoxidieren mit Hilfe von Anreicherungskulturen und der MPN-Methode durch. Dabei wurden unter anderem lithotrophe bzw. mixotrophe eisenoxidierende und nitratreduzierende Mikroorganismen aus verschiedenen Sedimentproben untersucht. Für diese Mikroorganismengruppen ergaben sich Zellzahlen im Bereich von  $5,5 \cdot 10^2$  Eisenoxidierer/gTS bis  $2,9 \cdot 10^6$  Eisenoxidierer/gTS [Straub und Buchholz-Cleven, 1998]. Im Vergleich zu diesen Zellzahlen lagen die Zellzahlen der Eisenoxidierer der drei Reaktorabläufe ( $3,5 \cdot 10^5 - 5,7 \cdot 10^6$  Zellen/gTS) zwar in der gleichen Größenordnung, jedoch wurden in den drei Reaktorabläufen teilweise höhere Zellzahlen bestimmt. Diese Abweichungen lassen sich auf die unterschiedlichen Probenahmestellen und die Inkubationsbedingungen zurückführen.

In einer weiteren MPN-Studie wurden unter anderem die Zellzahlen von Sulfatreduzierern und Eisenreduzierern in verschiedenen Grundwasserproben untersucht [Micic, 2006]. Für die Sulfatreduzierer wurden Zellzahlen im Bereich von  $2,4 \cdot 10^6$  Zellen/gTS bis

$2,7 \cdot 10^7$  Zellen/gTS bestimmt. In der vorliegenden Arbeit wurden  $2,5 \cdot 10^5$  Sulfatreduzierer/gTS bis  $5,4 \cdot 10^9$  Sulfatreduzierer/gTS mittels der MPN-Methode detektiert, wobei dieser große Bereich der ermittelten Zellzahlen auf die unterschiedlichen Substrate der Reaktoren zurückzuführen ist. Die Zellzahlen der MPN-Studie [Micic, 2006] liegen somit im Bereich der Zellzahlen, welche in den drei Reaktoren ermittelt wurden. Für die Eisenreduzierer wurden in der vorliegenden Arbeit Zellzahlen im Bereich von  $2,0 \cdot 10^7$  Zellen/gTS bis  $1,3 \cdot 10^9$  Zellen/gTS detektiert. In der MPN-Studie wurden hingegen viel geringere Zellzahlen im Bereich von  $2,4 \cdot 10^2$  Eisenreduzierer/gTS bis  $2,4 \cdot 10^4$  Eisenreduzierer/gTS bestimmt [Micic, 2006]. Diese unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich auch hier auf die verschiedenen Probenahmestellen und die verschiedenen Bedingungen während der Inkubationszeit zurückführen.



## 6 Zusammenfassung

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden anaerobe, thermophile, lignocellulolytische Mikroorganismen aus Seesedimenten angereichert. Das Ziel des Projektes, in dessen Rahmen diese Arbeit stattfand, ist es, das natürlich vorkommende Potential des anaeroben lignocellulolytischen Abbaus für den Biogasprozess nutzbar zu machen, indem lignocellulolytische Mikroorganismen angereichert werden. Dafür wurden die Mikroorganismen aus Seesedimentproben des Thermalsees Héviz in Ungarn, bei einem pH-Wert von 7,3 und 55 °C angereichert und später erfolgreich in frisches Medium überführt (1. Transfer). Als Lignocellulosequelle wurde zerkleinertes Weizenstroh verwendet und der Abbau mit Hilfe von GC-, HPLC-, pH-Wert-Messungen und Erfassung des kumulativen Gasvolumens während der Inkubationszeit von 21 bzw. 25 Tagen verfolgt. Die Hydrolyse des Substrates wurde gekennzeichnet durch die Gasproduktion, die mit der Abnahme des pH-Wertes, aufgrund der Bildung von organischen Säuren, vor allem Essigsäure, korrelierte. Dabei wurde das meiste Gas, sowohl in der Anreicherungskultur als auch in den Kulturen des 1. Transfers, während der ersten 14 bzw. 20 Tage gebildet und bestand hauptsächlich aus Kohlenstoffdioxid und Wasserstoff. In einer Kultur der Anreicherungskultur wurde ab Tag 14 auch Methan detektiert. Möglicherweise inhibierte die starke pH-Wert-Abnahme die Methanbildner innerhalb der restlichen Kulturen, welche während der gesamten Inkubationszeit kein Methan produzierten. Die vorliegenden Ergebnisse bestätigen, dass natürliche Habitate effektive lignocellulolytische Mikroorganismen enthalten. Inwieweit die Anreicherungskulturen das Potential besitzen, die Biogasproduktion aus lignocellulosehaltiger Biomasse zu erhöhen, muss in Folgeversuche bestimmt werden.

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden die Zellzahlen von Eisenoxidierern, sowie Eisen- und Sulfatreduzierern in drei verschiedenen Laborreaktoren mittels der MPN-Methode abgeschätzt. Dafür wurden ein Schlempereaktor mit FerroSorp<sup>®</sup>, ein Stroh- und Schlempereaktor ohne FerroSorp<sup>®</sup> und ein Hühnertrockenkotreaktor gewählt. Für die Abschätzung der Zellzahlen wurde aus den drei Reaktorabläufen jeweils eine Verdünnungsreihe hergestellt. Mit Hilfe von selektiven Wachstumsmedien für die drei Mikroorganismengruppen wurden anschließend aus den Verdünnungsreihen der Reaktorabläufe weitere Verdünnungsreihen in 96-Deep Well Platten mit jeweils sieben Parallelen angesetzt. Während der Inkubationszeit von sechs Wochen wurden die neun MPN-Platten wöchentlich optisch ausgewertet und am Ende der Inkubationszeit wurden für die genaue Abschätzung der Zellzahl photometrische Tests für  $\text{Fe}^{2+}$ , Gesamteisen ( $\text{Fe}_{\text{tot}}$ ) und Sulfid durchgeführt. Diese Tests zeigten, dass im reinen Schlempereaktor im Gegensatz zu den beiden anderen Reaktoren die meisten Eisenoxidierer, sowie

Eisen- und Sulfatreduzierer vorhanden waren, da dieser Reaktor proteinreiche und somit sulfathaltige Schlempe und zusätzlich die Eisenmineralmischung FerroSorp® enthielt. Im Stroh- und Schlempereaktor wurden weniger der drei Mikroorganismengruppen gefunden als im reinen Schlempereaktor, jedoch mehr als im Hühnertrockenkotreaktor, da dieser Reaktor proteinreiche Schlempe und zusätzlich Stroh enthielt. Zudem wurde dieser Reaktor zu Beginn mit einem Reaktorablauf, der FerroSorp® enthielt, angefahren wurde. Im Hühnertrockenkotreaktor waren am wenigsten Eisenoxidierer sowie Eisen- und Sulfatreduzierer vorhanden, da Hühnertrockenkot nur einen geringen Sulfat- und Eisengehalt aufwies. Die Erwartungen, dass aufgrund des eingesetzten Substrates im Hühnertrockenkotreaktor am wenigstens und im Schlempereaktor am meisten der untersuchten Mikroorganismengruppen vorhanden waren, wurden mit diesen Ergebnissen bestätigt.

## 7 Ausblick

Um die lignocellulolytischen Mikroorganismen aus dem Thermalsee Héviz in Ungarn besser zu verstehen bzw. zu charakterisieren und die gewonnenen Ergebnisse bezüglich des Abbaus von Getreidestroh in industriellen Systemen effektiv anwenden zu können, sind weitere umfassende Analysen notwendig. Zunächst sollten weitere Transfers aus den bisherigen Kulturen hergestellt werden, um zu beobachten, ob die Aktivität während der Transfers bestehen bleibt und um die lignocellulolytischen Mikroorganismen weiterhin anzureichern. Dabei sollte die Veränderung der mikrobiellen Gemeinschaft in den einzelnen Transfers, beispielsweise durch eine Analyse mittels T-RFLP (Terminale Restriktionsfragmentlängenpolymorphismus), untersucht werden. Dies ist eine molekularbiologische Methode, um einen Fingerprint von unbekannten mikrobiologischen Proben zu erhalten und um die mikrobiologische Diversität der Proben zu erfassen. Weiterhin wäre es wichtig, Bioaugmentationsversuche beispielsweise mit Hilfe eines AMPTS (automatisiertes Methanpotential-Testsystem) durchzuführen, um den Einfluss der Mikroorganismen auf die Gasproduktion von verschiedenen Substraten zu untersuchen. Dabei wird in einem Batchverfahren das Potential dieser Mikroorganismen zur Erhöhung der Biogasproduktion bestimmt. Weitere Versuche könnten klären, ob und inwieweit lignocelluloseverwertende Anreicherungskulturen zur Vorbehandlung, beispielsweise von Stroh, eingesetzt werden können. Somit könnte das Stroh mit Hilfe von lignocellulolytischen Mikroorganismen vorbehandelt werden, um dessen Abbaubarkeit und die Methanausbeute in Biogasreaktoren zu erhöhen.

In wieweit die Eisenoxidierer, Eisen- und Sulfatreduzierer mit anderen Mikroorganismen in den Reaktoren um das eingesetzte Substrat konkurrieren, muss mit weiteren Versuchen und mit der Identifikation der jeweiligen Mikroorganismen geklärt werden. Für alle drei untersuchten Mikroorganismengruppen sollten deshalb weitere Untersuchungen, auch mit anderen Reaktoren, stattfinden, um zusätzlich die Oxidation bzw. Reduktion dieser Mikroorganismengruppen zu verstehen und die daraus resultierenden Probleme, wie die Akkumulation von Schwefelwasserstoff oder Eisenmineralen zu verringern bzw. vollständig zu vermeiden. Zudem sollten weitere Versuche bezüglich der Huminstoffe, welche von den Eisenreduzierern für den Elektronentransport verwendet werden können, durchgeführt werden, um den stattfindenden Elektronentransport besser zu verstehen. Dafür könnten ebenfalls MPN-Platten mit einem weiteren selektiven Medium, welches diese Huminstoffe enthält, angesetzt werden. Auch in Bezug auf die Eisenoxidation sind weitere Untersuchungen notwendig, wie z.B. ob die nitratabhängige Eisenreduktion in den untersuchten Reaktoren überhaupt stattfindet und ob somit ein Eisenkreislauf in den Reaktoren möglich ist.

## Literatur

### 1 Monografien, Journalartikel, Gesetzblätter und Richtlinien

- Abdel-Rahman, M.; Tashiro, Y.; Kenji, S. (2011):** *Lactic acid production from lignocelluloses-derived sugars using lactic acid bacteria: Overview and limits*, Journal of Biotechnology, 156:286-301
- Althaus W.; Urban W. (2005):** *Analyse und Bewertung der Nutzungsmöglichkeiten von Biomasse*, 3. Band, Fraunhofer-Institut UMSICHT (Hrsg.), Oberhausen
- Angelidaki, I.; Ahrens, B. K. (1994):** *Anaerobic thermophilic digestion of manure at different ammonia loads: Effect of temperature*, Water Research, 28:727-731
- Bayerisches Landesamt für Umwelt (Hrsg.) (2007):** *Biogashandbuch Bayern - Materialienband*, Augsburg
- Benz, M.; Brune, A.; Schink, B. (1998):** *Anaerobic and aerobic oxidation of ferrous iron at neutral pH by chemoheterotrophic nitrate-reducing bacteria*, Archives of Microbiology, 169:159-165
- Boone, D.; Chynoweth, D. P.; Mah, R. A.; Smith, P. H.; Wilkie, A. C. (1993):** *Ecology and microbiology of biogasification*, Biomass and Bioenergy, 5:191-202
- Bujoczek, G.; Oleszkiewicz J.; Sparling R.; Cenkowski S. (2000):** *High solid anaerobic digestion of chicken manure*, Journal of Agricultural Engineering Research, 76:51-60
- Chen, Y.; Cheng J.; Creamer K. (2008):** *Inhibition of anaerobic digestion process: A review*, Bioresource Technology, 99:4044-4064
- Cline, J.D.; Broenkow, W.W. (1969):** *Spectrophotometric determination of hydrogen sulfide in natural waters*, Limnology and Oceanography, 14:454-458
- Demirel, B.; Scherer, P. (2008):** *The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane*, Reviews in Environmental Science and Biotechnology, 7:173-190
- Drent, W. J.; Lahpor, G. A.; Wiegant, W. M.; Gottschal, J. C. (1990):** *Fermentation of Inulin by Clostridium thermosuccinogenes sp. nov., a thermophilic anaerobic bacterium isolated from various habitats*, Applied and Environmental Microbiology, 57:455-462
- EEG 2012 (2011):** *Gesetz zur Neuregelung des Rechtsrahmens für die Förderung der Stromerzeugung aus erneuerbaren Energien*, Bundesgesetzblatt Teil I, 42:1634 -1678, Deutschland

- Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e. V. (Hrsg.) (2006):** *Handreichung - Biogasgewinnung und -nutzung*, 3. überarbeitete Auflage, Stadtdruckerei Weidner, Rostock, Deutschland
- Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (Hrsg.) (2010):** *Leitfaden Biogas - Von der Gewinnung zur Nutzung*, 5. vollständig überarbeitete Auflage, Stadtdruckerei Weidner, Rostock, Deutschland
- Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V. (Hrsg.) (2011):** *Basisdaten Bioenergie*, 8. überarbeitete Auflage, Stadtdruckerei Weidner, Rostock, Deutschland
- Ferry, J. G. (2011):** *Fundamentals of methanogenic pathways that are key to the biomethanation of complex biomass*, Current Opinion in Biotechnology, 22:351-357
- Gerardi, M. H. (2003):** *Anaerobic digestion stages* in The Microbiology of Anaerobic Digesters, Hrsg. Gerardi, M.H., John Wiley & Sons, Inc., New Jersey, USA
- Han, Y.W.; Smith, S.K.; Cheeke, P.R. (1979):** *Response of weaning meadow voles to a diet containing fermented straw*, Journal of Animal Science, 47:648-653
- Hedrich, S.; Schlömann, M.; Johnson, D.B. (2011):** *The iron-oxidizing protobacteria*, Microbiology, 157:1551-1564
- Hego Biotech GmbH (2008):** *Desulphurization substance for the removal of hydrogen sulphide in anaerobic processes*. Environmental Protection-State of the Art, 56:299-318
- Henkelmann, G.; Fischer, K.; Meyer zu Köcker, K. (2012):** *Zusatz- und Hilfsstoffe in Biogasanlagen*, Bericht, Biogasforum Bayern
- Hungate, R. E. (1969):** *A roll-tube method for cultivation of strict anaerobes*, in Methods in Microbiology, Hrsg. J. R. Norris and D. W. Ribbons, 3B:117-132, Academic Press, New York, USA
- Klee, Albert J. (1993):** *A computer program for the determination of most probable number and its confidence limits*, Journal of Microbiological Methods, 18:91-98
- Kruse, S.; Herrmann, A.; Taube, F. (2005):** *Genotypbedingte Veränderungen der Gehalte an Gerüstsubstanzen im Vegetationsverlauf von Silomais*, Bericht Jahrestagung Bad Elster
- Kumar, R.; Singh, S.; Singh, O. V. (2008):** *Bioconversion of lignocellulosic biomass: biochemical and molecular perspectives*, Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 35:377-391
- Lovley, D.R. (1997):** *Microbial Fe(III) reduction in subsurface environments*, FEMS Microbiology Reviews, 20:305-313

- Lovley, D. (2006):** *Dissimilatory Fe(III)- and Mn(III)reducing prokaryotes*, in The Prokaryotes, Hrsg. Dworkin, M.; Falkow, S.; Rosenberg, E.; Schleifer, K.H.; Stackebrandt, E., 2. Band, Springer Verlag, Berlin
- Madigan, M.T.; Martinko, J.M. (2006):** *Brock of biology of microorganisms*, 11.Auflage, Pearson Prentice Hall, New Jersey, USA
- Micic, V. (2006):** *Natural attenuation at a former gaswork site*, Masterthesis an der Universität Tübingen, Tübingen
- Nielsen, H. B.; Mladenovska, Z.; Ahring, B. K.(2007):** *Bioaugmentation of a two-stage thermophilic (68 °C/55 °C) anaerobic digestion concept for improvement of the methane yield from cattle manure*, Biotechnology and Bioengineering, 31:820-830
- Nultsch, W. (1968):** *Allgemeine Botanik*, 8. überarbeitete und erweiterte Auflage, Georg Thieme Verlag Stuttgart, Deutschland
- Poch, C. (2012):** *Abschätzung von Nitrat-, Eisen-und Sulfatreduzierern in Biogasreaktoren mittels der „Most Probable Number“ (MPN) Methode*, Praxisarbeit in der AG Mikrobiologie Anaerober Systeme am Helmholtz-Zentrum für Umweltforschung - UFZ, Leipzig, Deutschland
- Ren, N.; Wang, B.; Huang, J. (1996):** *Ethanol-type fermentation from carbohydrate in high rate acidogenic reactor*, Biotechnology and Bioengineering, 54:428-433
- Reuter, M.; Vater, D.; Duchow, V. (2010):** *Clostridium sporosphaeroides for the treatment of biomass*, WIPO Patent Application, WO 2010/072219 A1
- Rubin, E. M. (2008):** *Genomics of cellulosic biofuels*, Nature, 454:841-845
- Salama, I.; Koch G.; Tolley, H. (1978):** *On the estimation of the most probable number in a serial dilution technique*, Communications in Statistics - Theory and Methods, A7:1267-1281
- Schattner, S.; Gronauer, A. (2001):** *Methanbildung verschiedener Substrate - Kenntnisstand und offene Fragen*, in Energetische Nutzung von Biogas - Stand der Technik und Optimierungspotential, Hrsg. Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V., Band 15, Stadtdruckerei Weidner, Rostock, Deutschland
- Schieder, D.; Gronauer, A.; Lebuhn, M.; Bayer, K.; Beck, J.; Hiepp, G.; Binder, S. (2010):** *Prozessmodell Biogas*, Bericht, Biogasforum Bayern
- Schnürer, A.; Schink, B.; Svensson, B. H. (1996):** *Clostridium ultunense sp. nov., a mesophilic bacterium oxidizing acetate in syntrophic association with a hydrogenotrophic methanogenic bacterium*, International Journal of Systematic Bacteriology, 46:1145-1152

- Stams, A.J.M.; Plugge, C.M.; de Bok, F.A.M.; van Houten, B.H.G.W.; Dijkman, H.; Weijma, J. (2005):** *Metabolic interactions in methanogenic and sulfate-reducing bioreactors*, Water Science and Technology, 52:13-20
- Stolte, M. (2000):** *Investigations on sulphate concentrations of dried whey products and milk replacers as well as on their effects on faeces quality, apparent digestibility of organic matter und minerals in calves*, Dissertation an der Tierärztlichen Hochschule Hannover, Hannover
- Stookey, L.L. (1970):** *Ferrozine - A new spectrophotometric reagent for iron*, Analytical Chemistry, 42:779-781
- Straub, K.L.; Benz, M.; Schink, B.; Widdel, F. (1998):** *Anaerobic, nitrate-dependent microbial oxidation of ferrous iron*, Applied and Environmental Microbiology, 62:1458-1460
- Straub, K.L.; Benz, M.; Schink, B. (2001):** *Iron metabolism in anoxic environments at neutral pH*, FEMS Microbiology Ecology, 34:181-186
- Straub, K.L.; Buchholz-Cleven, B.E.E. (1998):** *Enumeration and detection of anaerobic ferrous iron-oxidizing, nitrate-reducing bacteria from diverse European sediment*. Applied and Environmental Microbiology, 64:4846-4856
- Taherzadeh, M. J.; Karimi, K. (2008):** *Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production*, International Journal of Molecular Science, 9:1621-1651
- Van der Zant, W. C.; Camp, B. J. (2006):** *Proteolytic enzymes from Pseudomonas putrefaciens*, Journal of Food Science, 22:158-163
- Weber, K.A.; Achenbach, L.A.; Coates, J.D. (2006):** *Microorganisms pumping iron: anaerobic microbial iron oxidation and reduction*, Nature, 4:752-764
- Weiland, P. (2003):** *Biologie der Biogaserzeugung*, Bericht, Bundesforschungsanstalt für Landwirtschaft (FAL), Biogastagung
- Weiland, P. (2010):** *Biogas production: current state and perspectives*, Applied Microbiology and Biotechnology, 85:849-860
- Widdel, F.; Kohring, G. W.; Mayer, F. (1983):** *Studies in dissimilatory sulfatereducing bacteria that compose fatty acids. III. Characterization of the filamentous gliding Desulfonema limicola gen. nov. sp. nov., and Desulfonema magnum sp. nov.*, Archives of Microbiology, 134:286-294.
- Widdel, F.; Bak, F. (1992):** *Gram-negative mesophilic sulfate-reducing bacteria*, in The Prokaryotes, Hrsg. Balows, A., Trüper H., Dworkin M.; Harder W.; Schleifer, K.H., 2. Auflage, SpringerVerlag, New York, USA

**Widdel, F.; Hansen, T.A. (1992):** *The dissimilatory sulfate- and sulfur-reducing bacteria*, in The Prokaryotes, Hrsg. Dworkin, M.; Balows, A.; Truper, H.G.; Schleifer, K.H., 1. Band, Springer Verlag, Berlin

**Widdel, F.; Pfennig, N. (1981):** *Studies on dissimilatory sulfate-reducing bacteria that decompose fatty acids in Desulfobacter postgatei* gen. nov. sp. nov., Archives of Microbiology, 129:395-400

**Zeller, V.; Weiser, C.; Hennenberg, K.; Reinicke, F.; Schaubach, K.; Thrän, D.; Vetter, A.; Wagner, B.(2011):** *Basisinformationen für eine nachhaltige Nutzung landwirtschaftlicher Reststoffe zur Bioenergiebereitstellung*, Schriftenreihe des Bundesumweltministerium-Förderprogramms Energetische Biomassenutzung, Hrsg. Deutsches Biomasse Forschungszentrum, 2. Band, Leipzig, Deutschland

## 2 Internetquellen

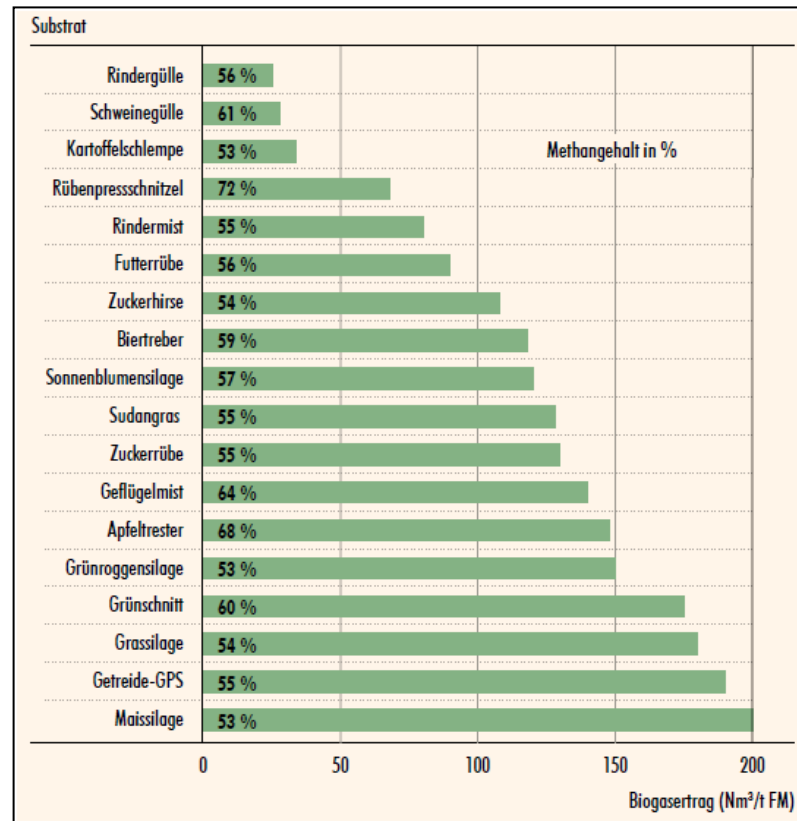
**URL-1: Leibniz Institut DSMZ - Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH: Liste empfohlener Medien,**  
URL: <http://www.dsmz.de/de/kataloge/katalogmikroorganismen/kultivierungshinweise/liste-empfohlener-medien.html>, Zugriff: 22.8.12

**URL-2: Satellitenbild Thermalsee Héviz:**  
[http://maps.google.de/maps?q=heviz%20thermalsee&rls=com.micros&oe=UTF8&rlz=117GGLL\\_de&redir\\_esc=&um=1&ie=UTF-8&hl=de&sa=N&tab=wl](http://maps.google.de/maps?q=heviz%20thermalsee&rls=com.micros&oe=UTF8&rlz=117GGLL_de&redir_esc=&um=1&ie=UTF-8&hl=de&sa=N&tab=wl), Zugriff: 22.8.12



## Anlagen

### Anlage 1 Gasausbeute verschiedener Substrate



**Abbildung A Gasausbeuten verschiedener Substrate** Dargestellt sind verschiedene Substrate, die typischerweise in Deutschland in Biogasanlagen eingesetzt werden, der Biogasertag dieser Substrate und der zugehörige Methangehalt in % [Fachagentur Nachwachsende Rohstoffe e.V., 2010].

## Anlage 2 Probenahmestelle im Thermalsee Héviz in Ungarn



**Abbildung B Sattelitenbild Thermalsee Héviz** Mit den Pfeilen sind die Probennahmestellen aus dem Sediment gekennzeichnet. Die Abkürzung Sed (Sediment) steht für die Probenahme aus der Bodenregion in Seemitte und die Abkürzung Typha steht für die Probenahme aus der Umgebung im Schilfgürtel in Ufernähe [URL-2].

## Anlage 3 Chemikalien, Geräte und Materialien

- ***für die Anreicherung lignocellulolytischer Mikroorganismen aus dem Seesediment eines Thermalsees***

### *Chemikalien:*

Alle Chemikalien mit der Ausnahme von Hefeextrakt und Pepton waren vom Reinheitsgrad "pro analysi". Pepton sowie Hefeextrakt waren für die Mikrobiologie. Die während dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland

Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Sigma-Aldrich, St. Louis, United States

*Geräte und Materialien:*

Anaerobbox	Typ B, Coy Laboratory Products Inc., Michigan, USA
2 mL-Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Butylgummistopfen für die Kulturflaschen	18 mm oberer Durchmesser, Ochs Laborbedarf, Bovenden, Deutschland
Brutschrank	Thermo Scientific 51015265, Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland
Einmalspritzen	1-30 mL Omnifix-F, B.Braun, Bad Arolsen, Deutschland
Einmal-Injektions-Kanüle	Sterican, 0,6 x 30 mm, B.Braun, Melsungen, Deutschland
Gaschromatograph	Chrompack Micro GC CP-2002P, Middelburg, Niederlande
Hohlstopfen für Headspace-Vials	20 mm Butylstopfen, Altmann Analytik GmbH & Co. KG, München, Deutschland
HPLC	Hi-PLex Säule, 300 mm x 7,7, mm, Agilent Technologies
HPLC-Vials	1,5 mL Gewindeflasche ND8, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Inserts für HPLC-Vials	0,2 mL Single Liner, VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Fluoreszenzmikroskop und Software	Axioplan 2 imaging, Carl Zeiss, Göttingen und AxioVision Release 4,8
Kulturflaschen	Rollrandflaschen, Ochs Laborbedarf, Bovenden, Deutschland

Spritzenfilter, steril	Cellulosemischester-Membran, 0,2µm  Porengröße, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Thoma-Kammer	0,1mm sowie 0,02mm Tiefe, Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf, Deutschland

- ***für die Abschätzung der Zellzahl verschiedener Mikroorganismengruppen in Biogasreaktoren mittels der MPN-Methode***

*Chemikalien:*

Alle Chemikalien waren vom Reinheitsgrad "pro analysi". Die während dieser Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von folgenden Firmen bezogen:

Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland

Sigma-Aldrich, St. Louis, United States

*Geräte und Materialien:*

Anaerobbox	Typ B, Coy Laboratory Products Inc., Michigan, USA
Anaeroclip	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Anaerocult A mini	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Anaerotest	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
2 mL-Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Butylgummistopfen für die Kulturfラスchen	18 mm oberer Durchmesser, Ochs Laborbedarf, Bovenden, Deutschland
Einmalspritzen	1-30 mL Omnifix-F, B.Braun, Bad Arolsen, Deutschland

Einmal-Injektions-Kanüle	Sterican, 0,6 x 30 mm, B.Braun, Melsungen, Deutschland
Kulturflaschen	Rollrandflaschen, Ochs Laborbedarf, Bovenden, Deutschland
MPN-Platten	96 Deep-Well-Platten, 1,2 mL, VWR International GmbH
Nitratesstäbchen	Halbquantitative Teststäbchen, Macherey-Nagel, Düren
Reagenzreservoirs	Brand GmbH & Co.KG, Wertheim
Spritzenfilter, steril	Cellulosemischester-Membran, 0,2 µm Porengröße, Fisher Scientific GmbH, Schwerte, Deutschland
Sterilfolien für MPN-Platten	Polyester, steril, Stärke 50 µm, Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe

## Anlage 4 Reaktorparameter

### *Hühnertrockenkotreaktor 3.1:*

- seit 6.5.11 täglich wie folgt gefüttert: 72 g Hühnertrockenkot, 340 g entstickter Gärrest aus Reaktor 3.1, 15 g fester Gärrest (gemahlen auf  $\leq 2$  mm) aus Reaktor 3.1
- kontinuierlicher Rührer bei 100 rpm
- ca. 11 Liter Gas/Tag
- TS am 21.6.12: 0,52 gTS/gFM

### *Schlempereaktor 4.1:*

- 721,21 g Schlempe von Protigrain 8
- kontinuierlicher Propellerrührer
- ca. 30-35 Liter Gas/Tag
- TS am 19.6.12: 0,51 gTS/gFM

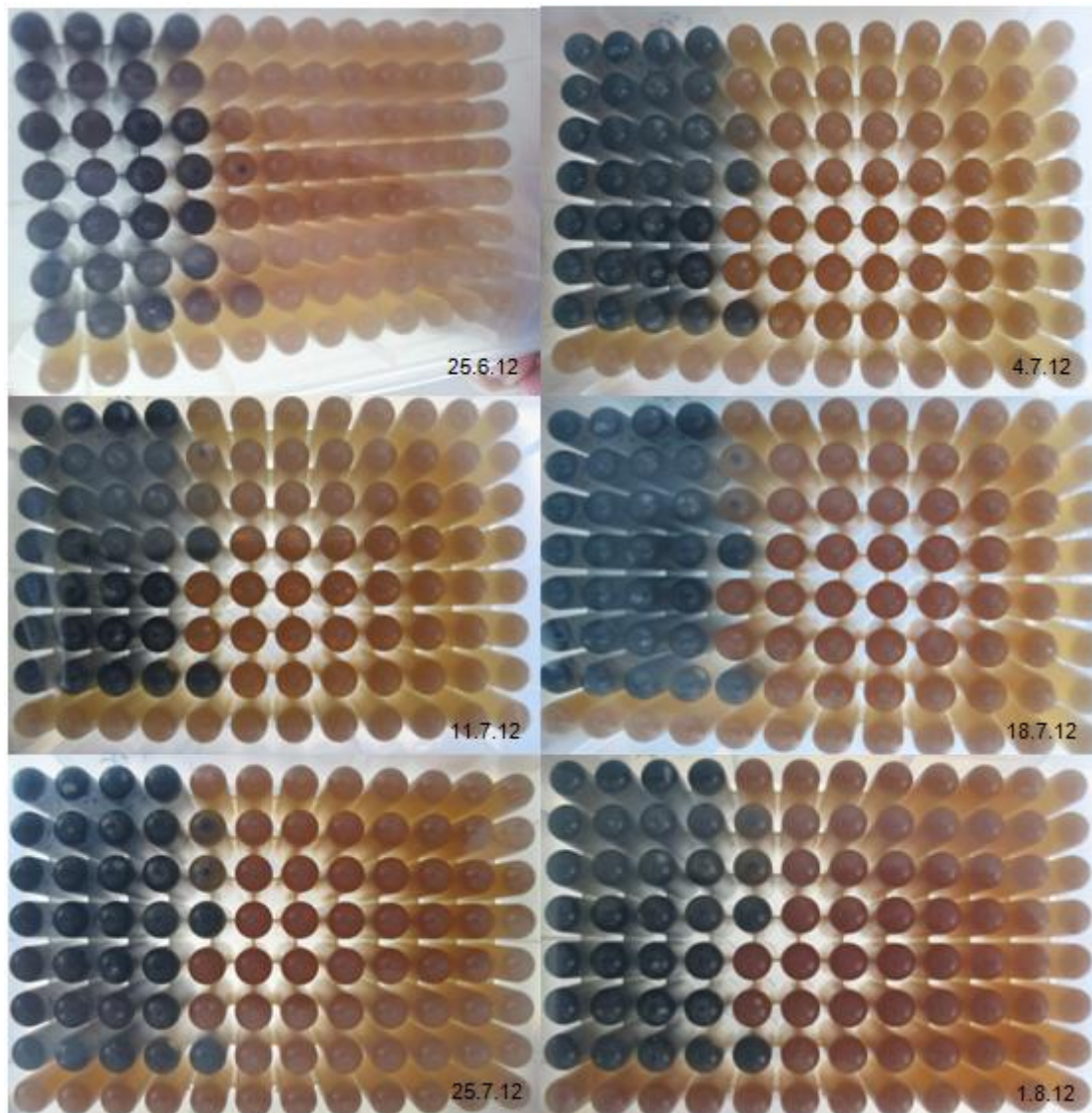
*Stroh-und Schlemperaktor 4.12:*

- pH Wert: 7,8
- ca. 16 Liter Gas/Tag
- 8,9 g Stroh und 15 g Schlempepellets pro Tag
- TS am 20.6.12: 0,51 gTS/gFM

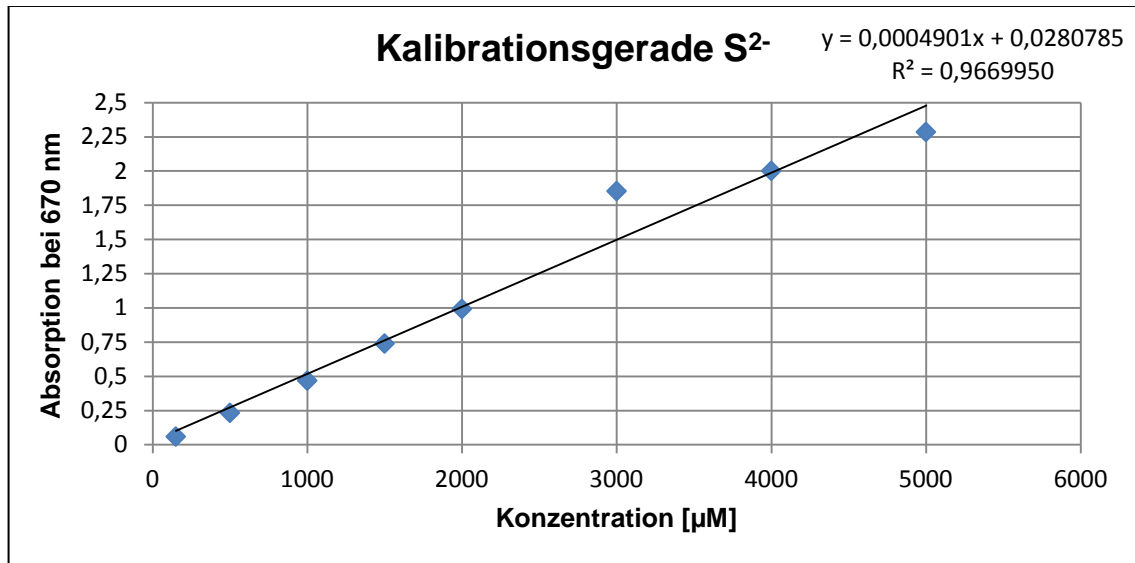
**Anlage 5 MPN-Platte und Reagenzreservoir**

**Abbildung C MPN-Platte und Reagenzreservoir** Dargestellt ist ein Reagenzreservoir mit Deckel, mit dem die Medien und die Verdünnungen der Reaktorabläufe in die ebenfalls abgebildete Well-Platte (MPN-Platte) pipettiert wurden.

## Anlage 6 MPN-Platte mit Eisen(III)-Citrat des Reaktors 4.12 (Stroh- und Schlepereaktor)

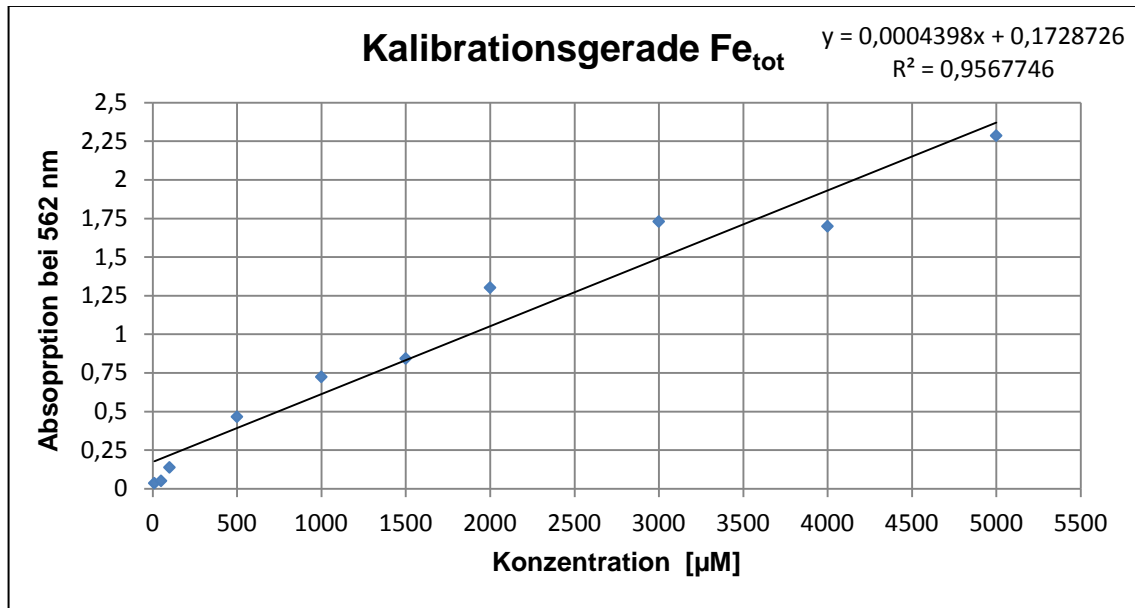


**Abbildung D optische Beobachtungen MPN-Platte mit Eisen(III)-Citrat des Stroh- und Schlepereaktors (Reaktor 4.12)** Dargestellt ist die optische Beobachtung der MPN-Platte mit Eisen(III)-Citrat als Elektronenakzeptor des Stroh- und Schlepereaktors während der Inkubationszeit von sechs Wochen. Dies soll exemplarisch für alle Platten gelten. Die MPN-Platte wurde am 19.6.2012 angesetzt. Die Daten in der Abbildung geben den Tag an, an dem die Platte fotografiert wurde. Es lässt sich eine zunehmende schwarze Verfärbung der Wells erkennen, aufgrund dessen diese Wells bei der optischen Auswertung als positiv gewertet wurden. Die letzte Zeile der Platten stellt jeweils die Negativkontrollen dar.

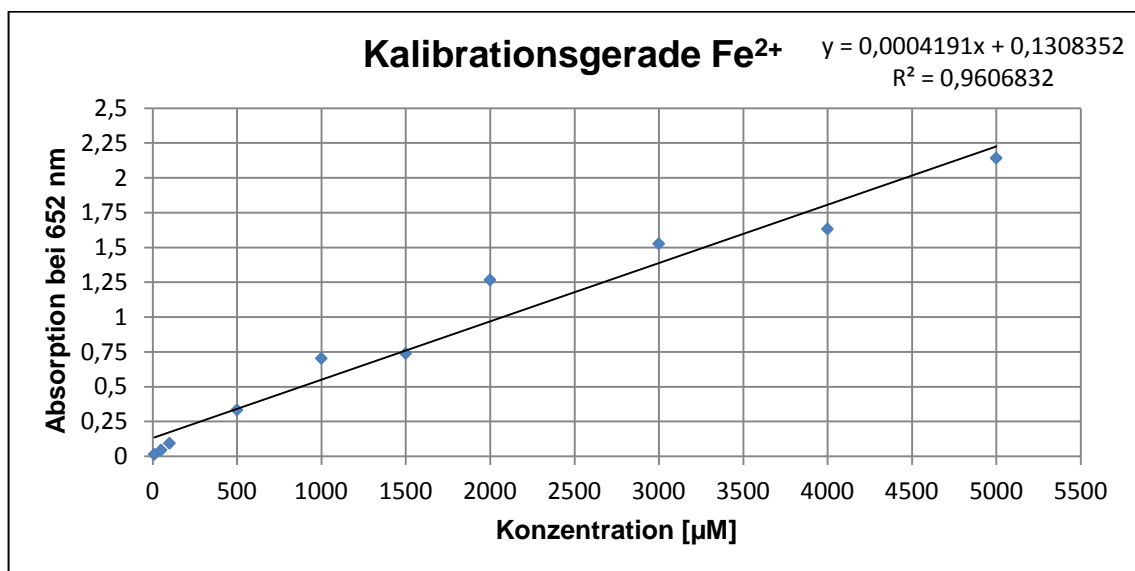
**Anlage 7 Kalibrationsgerade für den Sulfidtest**

**Abbildung E Kalibrationsgerade Sulfid** Dargestellt sind die Extinktionsergebnisse der Sulfidstandards (5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1,5 mM, 1 mM, 0,5 mM, 0,15 mM) bei 670 nm. Für die Herstellung der Sulfidstandards wurde eine Verdünnungsreihe von einer Stammlösung mit  $\text{Na}_2\text{S} \cdot 9\text{H}_2\text{O}$  angefertigt.



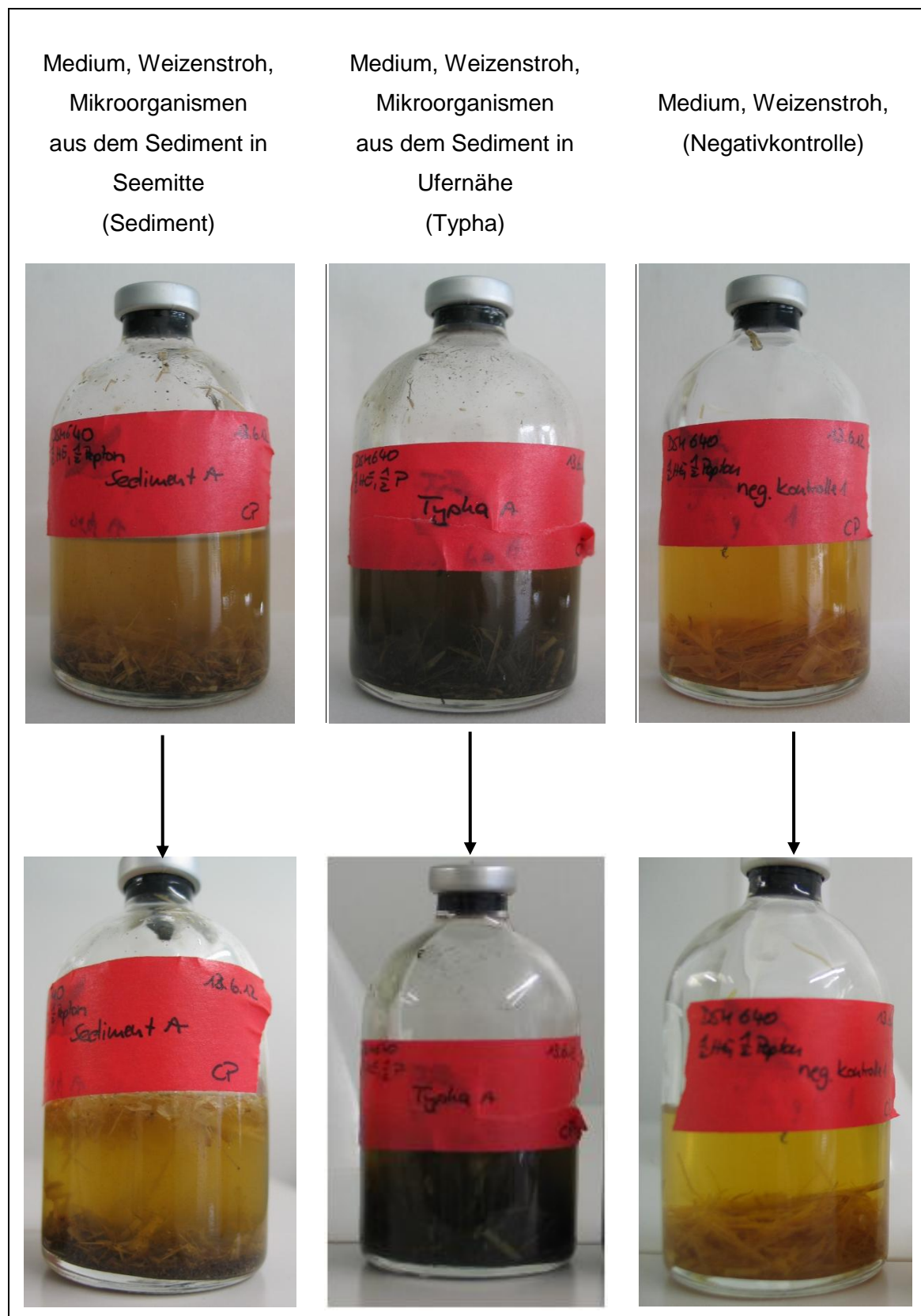
**Anlage 8 Kalibrationsgeraden für  $\text{Fe}_{\text{tot}}$  und  $\text{Fe}^{2+}$** 

**Abbildung F Kalibrationsgerade  $\text{Fe}_{\text{tot}}$**  Darstellung der Kalibrationsgeraden  $\text{Fe}_{\text{tot}}$ . Die Kalibrationsgerade wurde mit Hilfe von Standards mit  $\text{FeCl}_2$  (5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1,5 mM, 1 mM, 500  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ ) erstellt.



**Abbildung G Kalibrationsgerade  $\text{Fe}^{2+}$**  Dargestellt ist die Kalibrationsgerade für  $\text{Fe}^{2+}$ . Diese wurde mit Hilfe von Standards mit  $\text{FeCl}_2$  (5 mM, 4 mM, 3 mM, 2 mM, 1,5 mM, 1 mM, 500  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$ ) angefertigt.

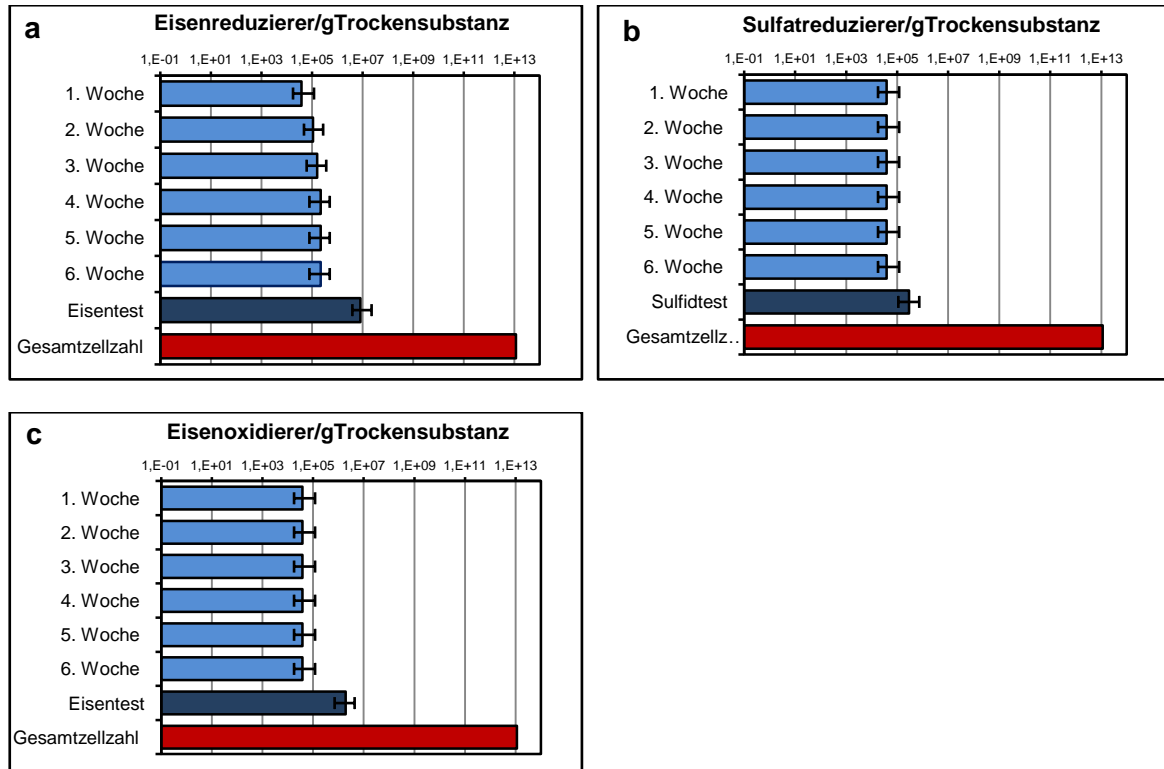
## Anlage 9



**Abbildung H Visuelle Analyse der Kulturen und der Negativkontrolle der Anreicherungskultur** Oben dargestellt sind die Kulturen bzw. die Negativkontrolle der Anreicherungskultur zu Beginn der Inkubation (14.6.12) und unten die gleichen Flaschen nach 3 Wochen Inkubationszeit.

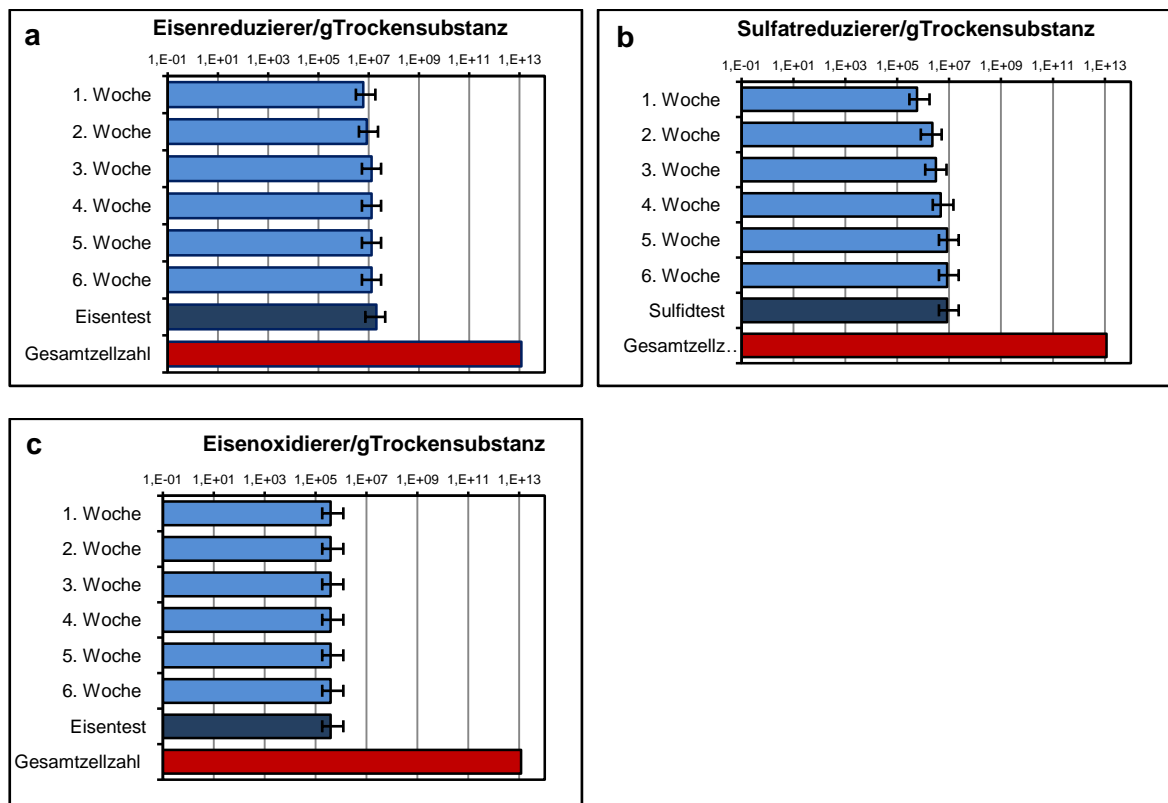
## Anlage 10 MPN-Ergebnisse des Reaktors 3.1 und des Reaktors 4.12

### Reaktor 3.1



**Abbildung I Most Probable Number des Reaktors 3.1 (Hühnertrockenkotreaktor)** für (a) Eisenreduzierer, (b) Sulfatreduzierer, (c) Eisenoxidierer; Dargestellt sind die Ergebnisse der optischen Beobachtungen während der Inkubationszeit (hellblau), die Ergebnisse des jeweiligen photometrischen Tests ( $\text{Fe}^{2+}$ -,  $\text{Fe}^{\text{tot}}$ - und Sulfidtest) (dunkelblau) und die Gesamtzellzahl des Reaktors (rot) in Zellen/gTrockensubstanz. Die Fehlerbalken geben das 95 % Konfidenzintervall an.

## Reaktor 4.12



**Abbildung J Most Probable Number des Reaktors 4.12 (Stroh- und Schlempereaktor)** für (a) Eisenreduzierer, (b) Sulfatreduzierer, (c) Eisenoxidierer; Dargestellt sind die Ergebnisse der optischen Beobachtungen während der Inkubationszeit (hellblau), die Ergebnisse des jeweiligen photometrischen Tests ( $\text{Fe}^{2+}$ -,  $\text{Fe}^{\text{tot}}$ - und Sulfidtest) (dunkelblau) und die Gesamtzellzahl des Reaktors (rot) in Zellen/gTrockensubstanz. Die Fehlerbalken geben das 95 % Konfidenzintervall an.

## **Selbstständigkeitserklärung**

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und nur unter Verwendung der angegebenen Literatur und Hilfsmittel angefertigt habe.

Stellen, die wörtlich oder sinngemäß aus Quellen entnommen wurden, sind als solche kenntlich gemacht.

Diese Arbeit wurde in gleicher oder ähnlicher Form noch keiner anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Mittweida, den 29. August 2012

Carolin Poch